

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM  
PEMBENTUKAN ETANOL DARI FERMENTASI WHEY  
MENGUNAKAN *Saccharomyces cereviceae***

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Oleh:

**TITIK DWI PERMATASARI**  
**0510920060-92**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2009**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM  
PEMBENTUKAN ETANOL DARI FERMENTASI WHEY  
MENGUNAKAN *Saccharomyces cereviceae***

Oleh:

**TITIK DWI PERMATASARI**

**0510920060-92**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal .....  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes**  
**NIP. 197203262002122001**

**Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc**  
**NIP. 195807111992032002**

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas MIPA Universitas brawijaya**

**Dr. Sasangka Prasetyawan, M.S**  
**NIP. 196304041987011001**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Titik Dwi Permatasari  
NIM : 0510920060-92  
Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul:

**Penentuan Kondisi Optimum Pembentukan Etanol Dari Fermentasi Whey Menggunakan *Saccharomyces cereviceae***

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

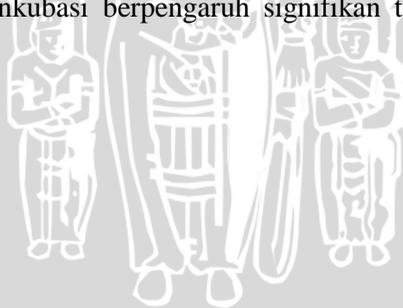
Malang, November 2009  
Yang menyatakan,

Titik Dwi Permatasari  
0510920060-92

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM  
PEMBENTUKAN ETANOL DARI FERMENTASI WHEY  
MENGUNAKAN *Saccharomyces cereviceae***

**ABSTRAK**

Whey merupakan hasil samping proses koagulasi susu. Whey mengandung 4,21% laktosa sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan etanol melalui fermentasi dengan bantuan sukrosa 13% dan *Saccharomyces cereviceae*. Fermentasi dipengaruhi oleh penggunaan substrat dan mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum pembentukan etanol dari fermentasi whey. Penentuan kondisi optimum pembentukan etanol meliputi pH, suhu inkubasi dan lama inkubasi dengan variasi pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0, suhu inkubasi 30°C; 35°C; 40°C; 45°C dan lama inkubasi 0; 24; 48; 72; 96; 120 jam. Konsentrasi etanol dianalisis menggunakan metode titrasi redoks pada setiap variabel untuk menentukan kondisi optimum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum fermentasi whey adalah pada pH 5,5, suhu inkubasi 30°C dan lama inkubasi 96 jam menghasilkan 7,42 g/L etanol. Hasil kondisi optimum didukung uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$  menunjukkan bahwa pH, suhu inkubasi dan lama inkubasi berpengaruh signifikan terhadap etanol yang dihasilkan.



**DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITION  
IN ETHANOL FORMATION FROM WHEY FERMENTATION  
by *Saccharomyces cerevisiae***

**ABSTRACT**

Whey is a by product of milk coagulation process. Whey contains 4.21% lactose that can used as raw material in ethanol formation by fermentation with be 13% sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation is influenced by substrate and microorganism. The aim of this research was to investigate the optimum condition of ethanol formation from whey fermentation. Determination of optimum condition included of pH, incubation temperature and incubation time at variation of pH 4.5; 5.0; 5.5; 6.0, incubation temperature 30°C; 35°C; 40°C; 45°C and incubation time 0; 24; 48; 72; 96; 120 hours. The content of ethanol was analyzed by volumetric method at whole variables to determine the optimum condition. The research showed that the optimal condition of whey fermentation was reached at pH 5.5, incubation temperature 30°C and incubation time 96 hours producing 7.42 g/L ethanol. The result of research was supported by analysis of least significant different (LSD) with  $\alpha = 0.05$  showed that pH, incubation temperature and incubation time influence ethanol production significantly.

## KATA PENGANTAR

***Bismillahirrokhmannirrokhim,***

*Alhamdulillah* rabbilalamin, puji syukur ke hadirat Allah SWT. Rabb alam semesta. Rasa syukur yang terdalam atas segenap kasih sayang-Nya yang tcurahkan melalui hamba-hambaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi berjudul **“Penentuan Kondisi Optimum Pembentukan Etanol Dari Fermentasi Whey Menggunakan *Saccharomyces cereviceae*”**. Penulisan Skripsi ditujukan sebagai salah satu syarat pencapaian derajat Sarjana Sains dalam bidang Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Tersusunnya skripsi ini merupakan hasil dari dukungan dan bimbingan berbagai pihak, maka penulis hendak menyampaikan terimakasih terdalam kepada:

1. Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes, selaku Pembimbing I dan Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc, selaku Pembimbing II dan Pembimbing Akademik, yang telah berkenan meluangkan waktu, energi dan perhatian dalam proses penyusunan skripsi.
2. Drs. Dinar Purwonugroho, M.Si, Dr. Ani Mulyasuryani, MS, Ir. Bambang Poerwadi, MS, Dr. Soebiantoro, Apt.M.Sc, selaku Dosen Penguji yang telah berkenan meluangkan segenap waktu dan energi dalam menyempurnakan kandungan skripsi.
3. Dr. Sasangka Prasetyawan, M.S, selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
4. Seluruh civitas akademika Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya dan semua pihak yang telah membantu penulis selama penelitian hingga penyelesaian skripsi ini.
5. Ibunda Sri Maliyati dan Ayahanda Simin Wasito serta kakak dan adikku, atas do'a, ketulusan kasih sayang dan pengorbanannya.

Penulis menyadari adanya sejumlah keterbatasan dalam penyusunan skripsi ini, sehingga saran dan kritik merupakan kehormatan bagi saya dalam memperbaiki keterbatasan tersebut. Semoga skripsi ini dapat memberikan sumbangan yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, November 2009

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Hal</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xi
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan .....	3
1.5 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Whey .....	4
2.1 Laktosa .....	5
2.2 Fermentasi Pembentukan Etanol .....	5
2.2.1 Etanol .....	9
2.2.2. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi .....	11
2.2.2.1 Media .....	11
2.2.2.2 Sumber karbon .....	11
2.2.2.3 Sumber nitrogen .....	12
2.2.2.4 Mineral .....	12
2.2.2.5 Oksigen .....	13
2.2.2.6 Suhu .....	13
2.2.2.7 pH .....	13
2.2.2.8 Mikroorganisme .....	14
2.3 Tinjauan Tentang <i>Saccharomyces cereviceae</i> .	14
2.4 Hipotesa .....	15

### **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	16
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	16
3.2.1 Alat .....	16
3.2.2 Bahan .....	16
3.3 Tahap Penelitian .....	16
3.3.1 Pembuatan media fermentasi .....	16
3.3.2 Analisa kadar gula total .....	17
3.3.2.1 Penentuan panjang gelombang maksimum glukosa .....	17
3.3.2.2 Penentuan kurva baku glukosa .....	17
3.3.2.3 Analisa gula total dalam whey .....	17
3.3.3 Penentuan kondisi optimum pembentukan etanol .....	18
3.3.3.1 Penentuan pH optimum .....	18
3.3.3.2 Penentuan suhu inkubasi optimum .....	18
3.3.3.3 Penentuan lama inkubasi optimum .....	19
3.3.4 Proses penentuan konsentrasi etanol dalam larutan dengan metode reaksi redoks .....	19
3.3.4.1 Oksidasi etanol .....	19
3.3.4.2 Titrasi redoks .....	19

### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Penentuan pH Optimum .....	21
4.2 Penentuan Suhu Inkubasi Optimum .....	23
4.3 Penentuan Lama Inkubasi Optimum .....	25

### **BAB V KESIMPULAN DAN SARAN**

5.1 Kesimpulan .....	27
5.2 Saran .....	27

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	28
-----------------------------	----

<b>LAMPIRAN</b> .....	32
-----------------------	----

## DAFTAR TABEL

	<b>Hal</b>
Tabel 2.1	Komposisi Whey ..... 4
Tabel 2.2	Sifat Fisik Etanol ..... 10
Tabel 2.3	Pengaruh Temperatur Terhadap Kerja <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... 13
Tabel 2.4	Komposisi Sel Khamir ..... 14
Tabel 4.1	Hasil Analisis BNT 5% pH Terhadap Konsentrasi Etanol (g/L) ..... 21
Tabel 4.2	Hasil Analisis BNT 5% Suhu Inkubasi Terhadap Konsentrasi Etanol (g/L) ..... 24
Tabel 4.3	Hasil Analisis BNT 5% Lama Inkubasi Terhadap Konsentrasi Etanol (g/L) ..... 25
Tabel L.9.1	Data nilai absorbansi glukosa 40 ppm pada berbagai panjang gelombang ..... 42
Tabel L.9.2	Data nilai absorbansi glukosa berbagai konsentrasi hasil pengukuran pada panjang gelombang 490 nm ..... 43
Tabel L.9.3	Perhitungan persamaan regresi glukosa ..... 43
Tabel L.11.1	Konsentrasi etanol pada berbagai variasi pH .. 50
Tabel L.11.2	Analisis ragam pH terhadap konsentrasi etanol ..... 51
Tabel L.11.3	Hasil uji BNT 5% pH terhadap konsentrasi etanol ..... 52
Tabel L.12.1	Konsentrasi etanol pada berbagai variasi suhu inkubasi ..... 53
Tabel L.12.2	Analisis ragam suhu inkubasi terhadap konsentrasi etanol ..... 54
Tabel L.12.3	Hasil uji BNT 5% suhu inkubasi terhadap konsentrasi etanol ..... 55
Tabel L.13.1	Konsentrasi etanol pada berbagai variasi lama inkubasi ..... 56
Tabel L.13.2	Analisis ragam lama inkubasi terhadap konsentrasi etanol ..... 57
Tabel L.13.3	Hasil uji BNT 5% lama inkubasi terhadap konsentrasi etanol ..... 58

## DAFTAR GAMBAR

		<b>Hal</b>
Gambar 2.1	Struktur Laktosa .....	5
Gambar 2.2	Hidrolisis Laktosa .....	5
Gambar 2.3	Skema Metabolisme Glukosa Secara Keseluruhan .....	6
Gambar 2.4	Proses Glikolisis .....	7
Gambar 2.5	Tahap-Tahap Akhir Pada Fermantasi Etanol	8
Gambar 2.6	Struktur Kimia Etanol .....	9
Gambar 4.1	Hubungan antara pH dengan Konsentrasi Etanol .....	21
Gambar 4.2	Hubungan antara Suhu Inkubasi dengan Konsentrasi Etanol .....	23
Gambar 4.3	Hubungan antara Lama Inkubasi dengan Konsentrasi Etanol .....	25
Gambar L.9.1	Kurva penentuan panjang gelombang maksimum glukosa .....	42
Gambar L.9.2	Kurva baku glukosa .....	44
Gambar L.10	Skema alat untuk proses oksidasi .....	47

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Hal</b>
Lampiran 1. Penyiapan Larutan dan Bahan Untuk Analisa .....	32
Lampiran 2. Tahapan Penelitian .....	34
Lampiran 3. Diagram Pembuatan Media Fermentasi .....	35
Lampiran 4. Diagram Analisa Kadar Gula Total .....	36
Lampiran 5. Diagram Penentuan pH Optimum .....	38
Lampiran 6. Diagram Penentuan Suhu Inkubasi Optimum .....	39
Lampiran 7. Diagram Penentuan Lama Inkubasi Optimum .....	40
Lampiran 8. Diagram Penentuan Konsentrasi Etanol Menggunakan Metode Titrasi Redoks .....	41
Lampiran 9. Penentuan Kadar Gula Total Dalam Whey ..	42
Lampiran 10. Penentuan Konsentrasi Etanol Dalam Larutan Menggunakan Metode Titrasi Redoks .....	46
Lampiran 11. Hasil Konsentrasi Etanol pada Berbagai Variasi pH dan Analisa Statistik .....	50
Lampiran 12. Hasil Konsentrasi Etanol pada Berbagai Variasi Suhu Inkubasi dan Analisa Statistik ..	53
Lampiran 13. Hasil Konsentrasi Etanol pada Berbagai Variasi Lama Inkubasi dan Analisa Statistik ..	56



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Whey adalah serum susu yang dihasilkan dari industri pembuatan keju setelah proses pemisahan kasein dan lemak selama pengendapan susu. Whey merupakan polutan dari limbah produksi susu, setiap kilogram keju yang diproduksi menghasilkan 8-9 liter whey (Jenie dan Rahayu, 1993) sehingga whey dianggap sebagai limbah karena belum dapat dimanfaatkan lebih lanjut untuk dijadikan suatu produk yang lebih bernilai ekonomi.

Menurut Clark (1992), whey memiliki kandungan gizi, diantaranya 4,4-4,6% laktosa, 0,6-0,7% protein, 0,7% abu, 0,1% lemak. Laktosa merupakan disakarida alamiah yang dijumpai hanya pada binatang menyusui. Dalam metabolisme tubuh manusia yang normal, laktosa dihidrolisis secara enzimatis menjadi D-galaktosa dan D-glukosa, kemudian galaktosa diubah menjadi glukosa, yang dapat mengalami metabolisme (Fessenden dan Fessenden, 1989). Kandungan laktosa dalam whey berpotensi sebagai salah satu alternatif sumber karbohidrat yang dapat difermentasi menghasilkan etanol, selain dari bahan-bahan seperti tetes tebu, buah, pati dan selulosa.

Etanol atau sering disebut sebagai alkohol, merupakan suatu cairan bening, mudah menguap dan berbau khas. (Purba, 1996). Etanol dimanfaatkan, antara lain sebagai bahan baku industri, contoh: industri asam asetat dan asetaldehid; sebagai pelarut dalam industri, contoh: industri farmasi, kosmetika dan plastik; sebagai bahan desinfektan, contoh: peralatan kedokteran, rumah tangga dan peralatan di rumah sakit (Novitasari dkk, 2008); sebagai bahan bakar kendaraan bermotor dan dapat dicampur dengan bensin untuk menghasilkan gasohol (Rochmat dkk, 2006).

Berdasarkan uji pendahuluan yang telah dilakukan, koagulasi menggunakan asam dilakukan dengan penambahan asam asetat pada variasi konsentrasi 1%, 3%, 5%, 7% dan 9% (v/v) dari volume total susu dengan asam asetat 25%. Hasil koagulasi optimum pada penambahan asam asetat konsentrasi 1%. Pada konsentrasi tersebut antara curd dan bagian cair dapat terpisah dengan baik yang ditunjukkan dengan bentuk curd yang padat. Bagian cair yang terpisah dari curd dikenal sebagai whey (Fifianti, 2009).

Proses fermentasi memecah karbohidrat kompleks dengan bantuan mikroba sehingga diperoleh bahan-bahan organik sederhana yang diinginkan (Rochmat dkk, 2006). Fermentasi pembentukan etanol terjadi secara anaerob dengan bantuan *Saccharomyces cereviceae* yang berperan melepaskan enzim kompleks zimase untuk memecah glukosa menjadi etanol (Rochmat dkk, 2006). Selain *Saccharomyces cereviceae*, *Zymomonas mobilis* juga potensial memproduksi etanol, namun bakteri ini perlu dikembangkan lebih lanjut, karena toleransinya yang rendah terhadap garam dalam media dan membutuhkan media yang steril (Elevri, 2006). Oleh karena itu dipilih *Saccharomyces cereviceae* karena mikroorganisme ini cepat berkembang biak, tahan terhadap konsentrasi etanol yang tinggi, mempunyai sifat stabil dan cepat beradaptasi (Wijiyono, 2008).

Fermipan merupakan *Saccharomyces cereviceae* yang mengandung nutrisi tambahan yang menunjang viabilitas sel. Sumber karbohidrat dalam bentuk monosakarida di dalam fermipan berfungsi sebagai agen nutrisi untuk pertumbuhan, sodium karbonat sebagai kontrol pH dan vitamin B sebagai pembawa gugus asetaldehida (Binati, 2008). Karbohidrat yang digunakan sebagai media fermentasi memiliki kisaran total gula optimum yang harus dicapai yaitu sebesar 14-18% (Sa'id, 1987). Fermentasi juga memerlukan senyawa nitrogen baik dalam bentuk organik maupun anorganik (Suhartono, 1989). Menurut Wijiyono (2008), penambahan amonium sulfat mampu meningkatkan populasi sel, laju fermentasi dan peningkatan etanol. Penambahan amonium sulfat berfungsi untuk membantu proses penguraian gula yang terjadi karena adanya rangsangan dari protein.

Fermentasi dipengaruhi oleh perubahan kondisi lingkungan seperti pH, suhu, konsentrasi inokulum (Suharto, 1995), konsentrasi gula, O<sub>2</sub>, media, nitrogen, mineral (Judoamidjojo, 1990) serta substrat dan mikroorganisme yang digunakan. Pertumbuhan sebagian besar organisme sangat peka terhadap perubahan pH. Menurut Prescott dan Dunn (1981), pH yang digunakan dalam fermentasi pembentukan etanol dari tetes tebu adalah pH 4,0–6,0. Suhu mempengaruhi pertumbuhan, metabolisme dan aktivitas mikroorganisme (Tambunan, 1995). Menurut Dauly dan Rahman (1992), suhu optimum untuk fermentasi pembentukan etanol berkisar 28-35<sup>0</sup>C. Lama fermentasi optimum fermentasi pembentukan etanol tergantung kondisi fermentasi dan mikroorganisme yang digunakan.

Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi fermentasi whey menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk mengetahui kondisi optimum yang meliputi pH, suhu inkubasi dan lama inkubasi sehingga didapatkan produk etanol maksimum.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Bagaimana kondisi optimum (pH, suhu inkubasi dan lama inkubasi) pembentukan etanol yang dihasilkan dari fermentasi whey menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*?

## **1.3 Batasan Masalah**

Whey dihasilkan dari hasil samping koagulasi susu menggunakan asam asetat 1% (v/v), penambahan *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan fermipan sebanyak 3% (b/v), sukrosa 13% (b/v), amonium sulfat 0,25% (b/v).

## **1.4 Tujuan**

Mengetahui kondisi optimum pembentukan etanol yang dihasilkan dari fermentasi whey menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*.

## **1.5 Manfaat Penelitian**

Dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pemanfaatan whey untuk pembuatan etanol dengan cara fermentasi menggunakan fermipan, khususnya informasi tentang kondisi pH, suhu inkubasi dan lama inkubasi optimum fermentasi pembentukan etanol.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Whey

Pemanasan, pemberian enzim proteolitik, sentrifugasi dan pengasaman dapat menggumpalkan kasein membentuk curd. Setelah curd dikeluarkan, maka bagian yang tersisa dalam susu disebut whey (Shiddieq, 2007). Whey merupakan cairan bening berwarna kuning kehijauan yang diperoleh dari pengepresan dadih susu selama proses pembuatan keju (Clark, 1992). Menurut Jenie dan Rahayu (1993), whey adalah serum susu yang dihasilkan dari industri pembuatan keju setelah proses pemisahan kasein dan lemak selama pengendapan susu. Whey tersebut merupakan polutan terbesar dari limbah produksi susu, setiap kilogram keju yang diproduksi menghasilkan 8-9 liter whey.

Terdapat tiga metode yang biasa dilakukan pada tahap koagulasi susu. Metode pertama adalah koagulasi susu dengan menggunakan enzim, metoda kedua adalah koagulasi dengan menggunakan asam, metode ketiga adalah koagulasi dengan menggunakan asam dan pemanasan tinggi (Apriyantono, 2003).

Jenis whey ada beberapa macam tergantung pada jenis koagulan yang digunakan pada proses koagulasi dalam pembuatan keju. Whey manis diperoleh dari metode koagulasi menggunakan enzim seperti rennin, whey asam diperoleh dari metode koagulasi menggunakan asam seperti asam laktat, asam asetat, asam sitrat, atau whey yang telah diasamkan, dan yang terakhir adalah jenis whey teknis yang diperoleh dari metode koagulasi menggunakan asam, seperti HCl dan asam sulfat, dan pemanasan (Anonim<sup>9</sup>, 2008).

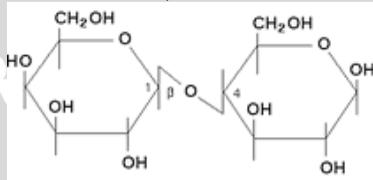
Tiga komponen utama dalam whey yaitu laktosa, protein dan mineral. Whey memiliki kisaran pH 4,6-4,8 (Clark, 1992).

Tabel 2.1 Komposisi Whey

Komposisi	Whey (%)
Total padatan	6,3-7,0
Laktosa	4,4-4,6
Protein	0,6-0,7
Lemak	0,1
Air	93,0
Abu	0,7

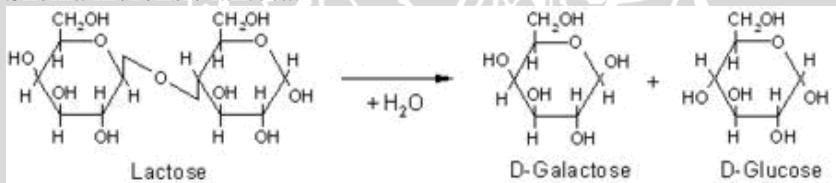
### 2.1.1 Laktosa

Laktosa merupakan disakarida alamiah yang dijumpai hanya pada binatang menyusui. Laktosa diperoleh secara komersial sebagai hasil samping pabrik keju. Dalam metabolisme tubuh manusia yang normal, laktosa dihidrolisis secara enzimatik menjadi D-galaktosa dan D-glukosa, kemudian galaktosa diubah menjadi glukosa, yang dapat mengalami metabolisme (Fessenden dan Fessenden, 1989).



Gambar 2.1 Struktur Laktosa

Terdapat 3 macam proses hidrolisis yang menghasilkan gula sederhana yang dapat diubah menjadi etanol, yaitu hidrolisis menggunakan asam encer, asam pekat, dan enzim (Rochmat dkk, 2006). Pada reaksi hidrolisis laktosa, air akan menyerang laktosa pada ikatan 1,4-  $\beta$  glikosida menghasilkan glukosa dan galaktosa. Skema hidrolisis laktosa:



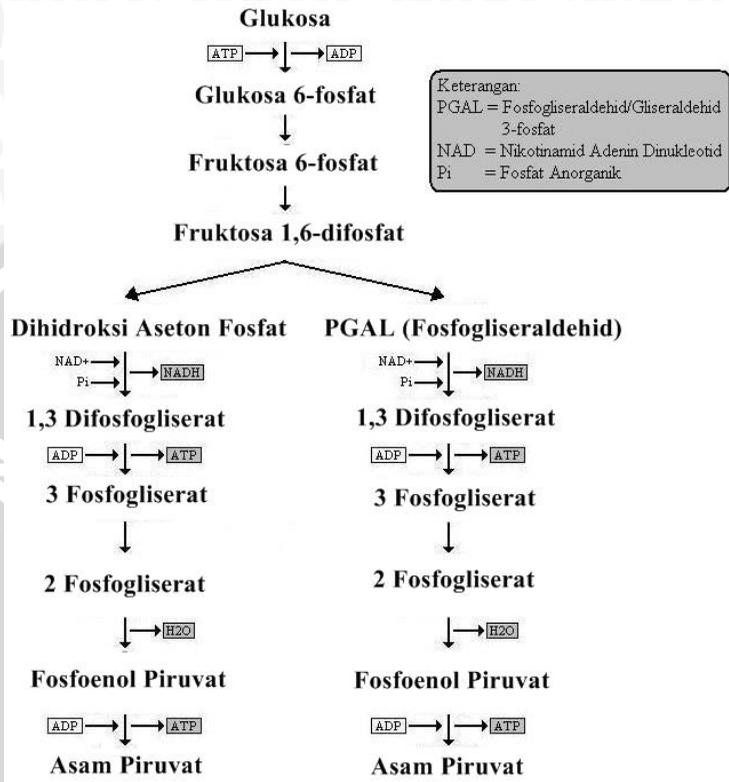
Gambar 2.2 Hidrolisis Laktosa

### 2.2 Fermentasi Pembentukan Etanol

Fermentasi adalah perubahan kimia senyawa organik baik dalam keadaan aerob maupun anaerob melalui kerja enzim yang dihasilkan oleh mikroba. Proses fermentasi memecah karbohidrat kompleks dengan bantuan mikroba sehingga diperoleh bahan-bahan organik sederhana yang diinginkan (Rochmat dkk, 2006).

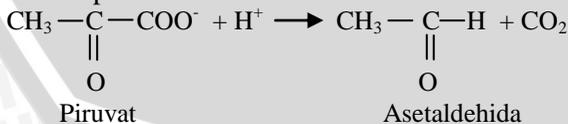
Fermentasi yang banyak dikenal adalah fermentasi yang menghasilkan etanol dari bahan gula. Pada fermentasi pembentukan etanol bahan-bahan yang mengandung monosakarida, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> sebagai glukosa, dapat langsung difermentasi, akan tetapi disakarida, pati maupun karbohidrat kompleks harus dihidrolisis dulu menjadi monosakarida (Said, 1987). Fermentasi pembentukan etanol terjadi





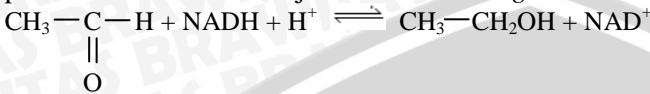
Gambar 2.4 Proses Glikolisis

Fermentasi pembentukan etanol berbeda dari glikolisis hanya di dalam tahap-tahap terakhir saja. Menurut Lehninger (1982), pada ragi dan mikroorganisme yang melakukan fermentasi glukosa menjadi etanol dan  $\text{CO}_2$ , lintas enzimatik glukosa sama dengan glikolisis anaerobik. Kemudian piruvat yang dihasilkan dari pemecahan glukosa kehilangan gugus karboksilnya oleh kerja *piruvat dekarboksilase*. Reaksi ini merupakan dekarboksilasi sederhana dan tidak melibatkan oksidasi total piruvat, dan bersifat tidak dapat balik dalam sel.



Pada tahap akhir fermentasi pembentukan etanol, asetaldehida direduksi menjadi etanol, dengan NADH yang diberikan dari

dehidrogenasi gliseraldehida 3-fosfat, yang menghasilkan tenaga pereduksi ini melalui kerja *alkohol dehidrogenase*.

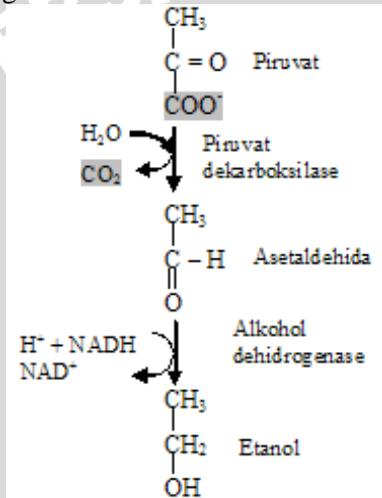


Asetaldehida

Etanol

Etanol dan  $\text{CO}_2$  merupakan produk akhir fermentasi pembentukan etanol.

Tahap-tahap akhir pada fermentasi pembentukan etanol dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2.5 Tahap-Tahap Akhir Pada Fermantasi Etanol

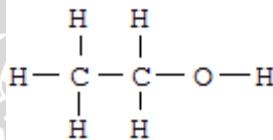
Etanol pada proses fermentasi terbentuk melalui beberapa jalur metabolisme bergantung jenis mikroorganismenya yang terlibat. Untuk *Saccharomyces* serta sejumlah khamir lainnya, etanol terbentuk melalui jalur Embden Meyerhof Parnas (EMP). Secara keseluruhan reaksinya sebagai berikut (Novitasari dkk, 2008):

1. Glukosa difosforilasi oleh ATP mula-mula menjadi D-glukosa 6-fosfat, kemudian mengalami isomerisasi berubah menjadi D-fruktosa 6-fosfat dan difosforilasi lagi oleh ATP menjadi D-fruktosa 1,6-difosfat.
2. D-fruktosa 1,6-difosfat dipecah menjadi satu molekul D-gliseraldehid 3-fosfat dan satu molekul aseton fosfat.
3. Dihidroksi aseton fosfat disederhanakan menjadi L-gliserol 3-fosfat oleh  $\text{NADH}_2$ .

4. ATP melepaskan satu molekul fosfat yang diterima oleh gliseraldehid 3-fosfat yang kemudian menjadi D-1,3 difosfoglisarat dan ADP.
5. D-1,3 difosfoglisarat melepaskan energi fosfat yang tinggi ke ADP untuk membentuk D-3 fosfoglisarat dan ATP.
6. D-3 fosfoglisarat berada dalam keseimbangan dengan D-2 fosfoglisarat.
7. D-2 fosfoglisarat membebaskan air untuk menghasilkan fosfoenol piruvat.
8. ATP menggeser rantai fosfat yang kaya energi dari fosfoenolpiruvat untuk menghasilkan piruvat dan ATP.
9. Piruvat didekarboksilasi menghasilkan asetaldehid dan  $\text{CO}_2$ .
10. Akhirnya asetaldehid menerima hidrogen dari  $\text{NADH}_2$  menghasilkan etanol.

### 2.2.1 Etanol

Alkohol merupakan senyawa organik, sering dipakai untuk menyebut etanol yang memiliki gugus hidroksil (-OH). Rumus kimia umum alkohol adalah  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{OH}$ . Ada tiga jenis utama alkohol yaitu alkohol primer, alkohol sekunder, dan alkohol tersier. Nama-nama ini merujuk pada jumlah atom karbon yang terikat pada karbon C-OH (Anonim<sup>a</sup>, 2003).



Gambar 2.6 Struktur Kimia Etanol

Etanol merupakan suatu cairan jernih dan tidak berwarna yang mudah larut (Rochmat dkk, 2006). Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), sering pula disebut sebagai “grain alcohol” atau alkohol saja. Sifat fisik kimia etanol terutama ditentukan oleh adanya gugus hidroksil yang memberikan sifat polaritas pada molekul dan menyebabkan terjadinya ikatan hidrogen antar molekul. Etanol bersifat tidak terlalu beracun karena tubuh dapat menguraikannya dengan cepat (Sardjoko, 1991). Pada suhu kamar etanol berupa zat cair bening, mudah menguap dan berbau khas (Purba, 1996).

Etanol banyak digunakan sebagai pelarut untuk membuat asetaldehid (Judoamidjojo, 1990), dapat dicampur dengan bensin untuk menghasilkan gasohol digunakan sebagai bahan bakar

kendaraan bermotor, dan biasa digunakan sebagai pelarut dalam pembuatan minyak wangi, cat, dan bahan peledak (Rochmat dkk, 2006).

Tabel 2.2 Sifat Fisik Etanol

Sifat Fisik	Jumlah
Massa molekul relative	46,07 g/mol
Titik beku	-114,1 <sup>0</sup> C
Titik didih normal	78,32 <sup>0</sup> C
Berat jenis pada 20 <sup>0</sup> C	0,7893 g/mL
Kelarutan dalam air, 20 <sup>0</sup> C	Sangat larut
Viskositas pada 20 <sup>0</sup> C	1,17 cP
Kalor spesifik pada 20 <sup>0</sup> C	0,579 kal/g <sup>0</sup> C
Kalor pembakaran, 25 <sup>0</sup> C	7092,2 kal/g
Kalor penguapan, 78,32 <sup>0</sup> C	200,6 kal/g

Etanol yang diperjualbelikan merupakan campuran yang mengandung 95% etanol dan 5% air dan tidak dapat dimurnikan lagi melalui destilasi. Untuk memindahkan air yang ada sehingga menghasilkan alkohol absolut dilakukan penambahan kapur (CaO) yang bereaksi dengan air menjadi kalsium hidroksida tapi tidak bereaksi dengan etanol (Hart, 1991).

Dalam perdagangan diketahui beberapa jenis alkohol berdasarkan mutunya adalah sebagai berikut (Anonymous<sup>a</sup>, 1999):

1. Alkohol absolut  
Merupakan jenis alkohol anhidrous yang dapat digunakan sebagai bahan baku antara industri kimia. Bahan pelarut dan bahan pereaksi di laboratorium. Alkohol absolut mempunyai kisaran kandungan etanol antara 98-99,7%.
2. Alkohol murni  
Jenis alkohol yang biasa digunakan sebagai bahan baku farmasi, kosmetik, dan bahan aditif untuk minuman keras. Alkohol ini hanya mengandung etil alkohol dan sedikit air, bebas dari bahan-bahan lain yang membahayakan kesehatan manusia. Kandungan etanol untuk alkohol jenis ini antara 96-96,5%.
3. Alkohol teknis  
Cairan alkohol yang mengandung etil alkohol dan air, tetapi masih mengandung bahan ikatan lain yang dapat membahayakan kehidupan manusia seperti: metil alkohol, aldehid, minyak fuses, ester, dan lain-lain. Konsentrasi etanolnya sekitar 94%.

#### 4. Spirtus

Jenis alkohol teknis yang sudah didenaturasi dan diberi pewarna biru atau ungu dan digunakan sebagai bahan bakar untuk alat pemanas atau penerangan juga sebagai bahan pelarut dalam industri kayu. Memiliki Konsentrasi etanol 94%.

#### 5. Alkohol industri

Jenis alkohol yang banyak digunakan untuk kepentingan industri, bahan pelarut organik dan bahan bakar.

### **2.2.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi**

Proses fermentasi sangat bergantung pada kecepatan reaksi dan konstanta reaksi. Kecepatan reaksi pada bioproses dipengaruhi oleh perubahan kondisi lingkungan seperti pH, suhu, tekanan, konsentrasi inokulum (Suharto, 1995). Menurut Judoamidjojo, dkk (1990) proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu konsentrasi gula, O<sub>2</sub>, pH, media, CO<sub>2</sub>, nitrogen, mineral, faktor tumbuh, suhu, tekanan, media, dan tekanan udara.

#### **2.2.2.1 Media**

Media menyediakan nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba untuk memperoleh energi, untuk pertumbuhan, membentuk sel, dan biosintesa produk-produk metabolit (Fardiaz dan Winarno, 1989). Media harus terdiri dari semua elemen esensial yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme, dalam proporsi yang hampir sama dengan yang terkandung dalam sel mikrobia itu sendiri (Riviere, 1977).

Beberapa nutrisi merupakan faktor pembatas pada pertumbuhan mikrobia. Faktor pembatas tersebut merupakan sejumlah nutrisi yang harus ada dalam media pertumbuhan dalam jumlah tertentu. Jika faktor pembatas kurang dari yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroba maka akan mengganggu proses metabolisme (Sa'id, 1987).

#### **2.2.2.2 Sumber karbon**

Sumber karbon adalah bahan yang terbesar dalam kultur media. Kecuali alga dan bakteri yang menggunakan CO<sub>2</sub> sebagai sumber karbon, kebanyakan mikroorganisme yang digunakan dalam industri membutuhkan komponen organik sebagai sumber karbon dan energi (Riviere, 1977). Karbon termasuk cadangan di dalam sel. Sumber karbon didapat dari karbohidrat yaitu monosakarida (glukosa,

fruktosa, galaktosa), disakarida (maltosa, laktosa, sukrosa), trisakarida (rafinosa), dan polisakarida (pati, dekstrosa, pektin, selulosa) (Nurwantoro dan Abbas, 1996). Menurut Sa'id (1987) dalam pembuatan etanol, konsentrasi gula optimum adalah 14-18%. Mc William (2001) menyatakan bahwa pemecahan gula oleh khamir dilakukan dengan bantuan energi pada biosintesa, maka tidak semua gula diubah menjadi alkohol, beberapa diubah untuk memproduksi biomassa sel khamir, gliserol, dan asam suksinat.

### **2.2.2.3 Sumber nitrogen**

Pertumbuhan mikroorganisme industrial memerlukan senyawa nitrogen baik dalam bentuk organik maupun anorganik. Garam organik yang biasanya digunakan adalah garam-garam amonium nitrat atau urea. Sumber nitrogen organik yang terbukti bermanfaat adalah pepton, ekstrak khamir, tepung kedelai, dan lain-lain. Penambahan senyawa organik seringkali meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme dan produk kataboliknya (Suhartono, 1989).

Nutrisi yang ditambahkan pada proses fermentasi biasanya berupa amonium sulfat atau  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Sumber nitrogen lain yang dapat ditambahkan antara lain amonia, garam amonium, asam amino, peptida, pepton, nitrat atau urea 0,03% (b/v), semua penambahan tersebut tergantung dari jenis khamir yang digunakan (Sa'id, 1987).

### **2.2.2.4 Mineral**

Kebutuhan mikroorganisme akan mineral disesuaikan dengan kandungan unsur di dalam selnya. Komponen mineral utama yang umumnya dibutuhkan semua jenis mikroorganisme adalah fosfat, kalium, kalsium, sulfur, dan magnesium (Suhartono, 1989).

Media biotransfer harus mengandung zat nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme berupa senyawa organik, mineral, dan vitamin untuk mensintesa komponen sel dan sebagai sumber energi. Unsur makro yang dibutuhkan oleh mikroorganisme adalah karbon, nitrogen, oksigen, belerang, dan fosfor, sedangkan unsur mikro yang diperlukan dalam jumlah kecil adalah ion-ion logam seperti  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Fe}^{2+}$  yang berfungsi sebagai kofaktor. Selain itu, mikroorganisme juga membutuhkan vitamin yang kebanyakan berfungsi sebagai koenzim (Tambunan, 1995).

### 2.2.2.5 Oksigen

Suatu proses metabolisme dan kecepatan pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi O<sub>2</sub> dalam media yang mana pengaruhnya sama dengan nutrisi yang lain (Wibowo, 1990). Pada permulaan proses, khamir memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya, oleh karena itu diberi oksigen setelah terbentuk gas CO<sub>2</sub>, reaksi dikondisikan menjadi anaerob. Proses fermentasi pembentukan etanol dalam keadaan anaerob atau tidak ada oksigen agar khamir melakukan degradasi tidak sempurna sehingga gula diubah menjadi molekul etanol (Pretitis, 1990).

### 2.2.2.6 Suhu

Suhu mempengaruhi pertumbuhan, metabolisme dan aktivitas mikroorganisme. Pada suhu yang rendah, pertumbuhan dan kecepatan metabolisme akan lambat sedangkan pada suhu yang tinggi akan menyebabkan kematian mikroorganisme. Pertumbuhan dan metabolisme akan berlangsung baik jika telah mencapai suhu yang optimal (Tambunan, 1995). Suhu optimum untuk fermentasi pembentukan etanol berkisar 28-35°C (Daulay dan Rahman, 1992).

Tabel 2.3 Pengaruh Temperatur Terhadap Kerja *Saccharomyces cerevisiae*

Temperatur	Kondisi
1°C	Tidak aktif
15-20°C	Reaksi lambat
20-32°C	Pertumbuhan yang baik, merupakan temperatur yang cocok untuk fermentasi
>38°C	Reaksi lambat
60°C	Ragi mati

### 2.2.2.7 pH

Pertumbuhan sebagian besar organisme sangat peka terhadap perubahan pH karena setiap kelompok organisme mempunyai nilai pH optimal sendiri yang tertentu. Nilai optimal pH untuk pembentukan produk biasanya berbeda dengan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. pH diperkirakan berpengaruh pada permeabilitas dinding sel dan pada laju reaksi enzim yang menempel pada dinding sel (Smith, 1993). Menurut Prescott dan

Dunn (1981), pH yang digunakan dalam fermentasi pembentukan etanol dari tetes tebu adalah pH 4,0-6,0.

### 2.2.2.8 Mikroorganisme

Proses fermentasi juga dipengaruhi oleh penggunaan mikroorganisme. Setiap mikroorganisme memiliki komponen struktural membran sel sangat bervariasi antar spesies. Kebutuhan nutrisi dari setiap mikroorganisme pun berbeda. Bakteri pada umumnya membutuhkan nutrisi yang lebih kompleks dibandingkan khamir dan kapang. Setiap spesies mikroorganisme memiliki perbedaan kebutuhan nutrisi (Rahmadi, 2009).

### 2.3 Tinjauan tentang *Saccharomyces cereviceae*

*Saccharomyces* merupakan mikroorganisme bersel satu tidak berklorofil, termasuk kelompok Eumycetes (Wijiyono, 2008). *Saccharomyces cereviceae* adalah jamur bersel tunggal yang sangat dikenal untuk industri pembuatan roti dan etanol (Amerin, 1987).

Sumber karbon untuk *Saccharomyces cereviceae* adalah karbohidrat. Bila sumber karbon berupa di-, tri-, atau polisakarida maka substrat akan diubah terlebih dahulu menjadi heksosa melalui proses hidrolisis (Varnam and Sutherland, 1994). Kemudian enzim zimase, yang diproduksi secara alami oleh *Saccharomyces cereviceae*, mampu memfermentasi glukosa menghasilkan etanol dan gas karbondioksida (Faridah, 2008).

Tabel 2.4 Komposisi Sel Khamir

Unsur	Persen Bobot Kering
Karbon	49
Hidrogen	7
Oksigen	33
Nitrogen	9
Fosfor	1

Khamir *Saccharomyces cereviceae* bersifat anaerob fakultatif yaitu dapat hidup dengan atau tanpa menggunakan O<sub>2</sub> sebagai penerima elektron terakhir dalam metabolisme selnya. Dalam kondisi aerob sel khamir akan memperbanyak aktivitas pertumbuhan dan sedikit sekali menghasilkan etanol, sedangkan pada kondisi anaerob aktivitas khamir cenderung menghasilkan etanol (Maiorella, 1985). Daulay dan Rahman (1992) menyatakan kebanyakan khamir

mempunyai toleransi pH dan suhu yang cukup luas. Pada umumnya sel khamir dapat tumbuh dan memproduksi etanol secara efisien pada pH 3,5-6,0 dan suhu 28-35<sup>0</sup>C.

Beberapa kelebihan *Saccharomyces* dalam proses fermentasi yaitu mikroorganismenya ini cepat berkembang biak, tahan terhadap konsentrasi alkohol yang tinggi, tahan terhadap suhu yang tinggi, mempunyai sifat stabil dan cepat mengadakan adaptasi (Wijiyono, 2008).

## 2.7 Hipotesa

Diduga fermentasi pembentukan etanol akan optimum pada kisaran pH 4,0-6,0, suhu inkubasi 28-35<sup>0</sup>C, dan lama inkubasi > 60 jam.



## **BAB III**

### **MATODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang selama tiga bulan mulai bulan April-Juli 2009

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, termometer, hot plate, kertas saring, bola hisap, aluminium foil, stirer, kotak plastik, pH meter (merk Schoot-Gerate type CG 820), neraca analitik (merk Mettler Toledo AL 204), inkubator, spektrofotometer UV-Vis.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian, antara lain: susu segar, fermipan,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat (98%), fenol, larutan glukosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , KI,  $\text{NH}_3$  pekat,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , larutan amilum, dan aquades.

#### **3.3 Tahap Penelitian**

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu: penyiapan larutan dan bahan, pembuatan media fermentasi, analisa kadar gula total, penentuan kondisi optimum, yang terdiri dari: penentuan pH optimum, penentuan suhu inkubasi optimum dan penentuan lama inkubasi optimum.

##### **3.3.1 Pembuatan media fermentasi**

Susu sapi segar dipanaskan pada hot plate hingga suhunya mencapai  $70\text{-}80^\circ\text{C}$ . Selanjutnya dituang dalam wadah plastik, didinginkan sampai suhu  $30^\circ\text{C}$ , ditambah dengan larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  sebanyak 1% (v/v). Diaduk perlahan kemudian didiamkan hingga terbentuk gumpalan. Selanjutnya dipisahkan curd dari whey menggunakan kertas saring. Diukur volume whey yang didapatkan.

### 3.3.2 Analisa kadar gula total

#### 3.3.2.1 Penentuan panjang gelombang maksimum glukosa

Larutan glukosa 40 ppm sebanyak 1,0 mL dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah berisi 1,0 mL larutan fenol 5%, diaduk. Selanjutnya, ditambahkan 5,0 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung dan diaduk kembali. Setelah didinginkan selama 30 menit, diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada berbagai panjang gelombang, yaitu mulai 450-510 nm. Dibuat grafik antara serapan terhadap panjang gelombang yang digunakan. Dari grafik akan diketahui panjang gelombang maksimum yaitu panjang gelombang yang menghasilkan serapan maksimum.

#### 3.3.2.2 Pembuatan kurva baku glukosa

Larutan baku glukosa pada berbagai konsentrasi yaitu 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm dipipet sebanyak 1,0 mL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 1,0 mL larutan fenol 5%, diaduk. Selanjutnya, ditambahkan 5,0 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung dan diaduk kembali. Setelah didinginkan selama 30 menit, ditentukan serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya yang didapat dari prosedur 3.3.2.1. Kurva baku glukosa dibuat berdasarkan data nilai serapan berbagai konsentrasi dengan menggunakan persamaan regresi lurus  $Y = bX$ . Nilai  $b$  (slope) dan  $r$  (koefisien korelasi) ditentukan dengan persamaan berikut:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i}{\sum X_i^2} \quad \dots (3.1)$$

$$r = \frac{\sum X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}} \quad \dots (3.2)$$

Pembuatan larutan standar glukosa dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### 3.3.2.3 Analisa kadar gula total dalam whey

Dipipet 3,0 mL whey ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas. Selanjutnya, dipipet whey yang telah diencerkan tadi sebanyak 2,0 mL ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan lagi sampai tanda batas. Dipipet 1,0 mL larutan whey tersebut dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 1,0 mL larutan fenol 5%, diaduk. Selanjutnya

ditambahkan 5,0 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung dan diaduk kembali. Setelah didinginkan selama 30 menit, diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap blanko.

Perhitungan kadar gula total:

$$Y = b X$$

$$X = s \text{ (ppm)}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar gula total} &= s \text{ (ppm)} \times fp \\ &= t \text{ (ppm)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar gula total (\%)} &= t \text{ mg/L} \times 1 \text{ g/1000 mg} \times 1\text{L/1000mL} \times 100\% \\ &= u\% \end{aligned}$$

dimana:

Y = A = nilai absorbansi sampel

fp = faktor pengenceran

### **3.3.3 Penentuan kondisi optimum pembentukan etanol**

#### **3.3.3.1 Penentuan pH optimum**

Whey sebanyak 85 mL dimasukkan dalam beaker glass 100 mL, ditambahkan 13 gram sukrosa dan diaduk, ditambahkan dengan 0,25 gram (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan diaduk. Selanjutnya diatur pHnya menggunakan pH meter, pada variasi pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 dengan penambahan CH<sub>3</sub>COOH 25% atau NH<sub>3</sub> pekat. Volume total dibuat menjadi 100 mL. Kemudian dipanaskan sampai suhu 30°C, ditambahkan fermipan sebanyak 3 gram. Kemudian fermentor ditutup dan diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator pada suhu 30°C. Kemudian ditentukan konsentrasi etanol dengan metode titrasi redoks.

#### **3.3.3.2 Penentuan suhu inkubasi optimum**

Whey sebanyak 85 mL dimasukkan dalam beaker glass 100 mL, ditambahkan 13 gram sukrosa dan diaduk, ditambahkan dengan 0,25 gram (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan diaduk. Selanjutnya diatur pHnya menggunakan pH meter pada pH optimum dengan penambahan CH<sub>3</sub>COOH 25% atau NH<sub>3</sub> pekat. Volume total dibuat menjadi 100 mL. Kemudian dipanaskan pada variasi suhu 30°C, 35°C, 40°C dan 45°C, ditambahkan fermipan sebanyak 3 gram. Kemudian fermentor ditutup dan diinkubasi selama 24 jam di dalam oven dengan suhu inkubasi sesuai dengan variasi suhu masing-masing. Kemudian ditentukan konsentrasi etanol dengan metode titrasi redoks.

### **3.3.3.3 Penentuan lama inkubasi optimum**

Whey sebanyak 85 mL dimasukkan dalam beaker glass 100 mL, ditambahkan 13 gram sukrosa dan diaduk, ditambahkan dengan 0,25 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan diaduk. Selanjutnya diatur pHnya menggunakan pH meter pada pH optimum dengan penambahan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  25% atau  $\text{NH}_3$  pekat. Volume total dibuat menjadi 100 mL. Kemudian dipanaskan pada suhu inkubasi optimum, ditambahkan fermipan sebanyak 3 gram. Kemudian fermentor ditutup dan diinkubasi dengan variasi waktu 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam di dalam inkubator dengan suhu inkubasi optimum. Kemudian ditentukan konsentrasi etanol dengan metode titrasi redoks.

### **3.3.4 Proses penentuan konsentrasi etanol dalam larutan dengan metode reaksi redoks**

#### **3.3.4.1 Oksidasi etanol**

Dipindahkan 10 mL larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  dalam suasana asam ke dalam erlenmeyer 250 mL. Dipipet 1 mL larutan sampel dan dimasukkan ke wadah sampel yang berupa labu ukur 5 mL. Selanjutnya, wadah yang berisi sampel tersebut digantung di atas larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  dan ditahan dengan penutup. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $30^\circ\text{C}$  di dalam inkubator.

#### **3.3.4.2 Titrasi redoks**

Erlenmeyer dikeluarkan pada suhu kamar, dibuka penutupnya dan dikeluarkan wadah yang berisi sampel. Dicuci dinding erlenmeyer dengan aquades dan dibuat volumenya menjadi 100 mL. Selanjutnya ditambahkan 1 mL KI dan digoyang. Langkah selanjutnya, siapkan larutan blanko, dipipet 10 mL larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  ke dalam erlenmeyer 250 mL, ditambah dengan 100 mL aquades dan 1 mL KI, digoyang. Isi buret dengan larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  dan titrasi masing-masing erlenmeyer. Ketika warna coklat iodine berubah menjadi kuning, ditambahkan 1 mL amilum dan dititrasi kembali sampai warna biru kehitaman dari kompleks indikator dan iodine menjadi tidak berwarna. Dicatat volume titrasi. Kemudian dilanjutkan dengan titrasi sampel.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Media fermentasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu whey. Whey merupakan hasil samping proses koagulasi susu. Whey mengandung laktosa yang dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan etanol. Whey dianalisa secara kuantitatif untuk mengetahui kadar gula total. Kadar gula total yang terkandung dalam whey sebesar 4,21%. Perhitungan kadar gula total dapat dilihat pada lampiran 9.

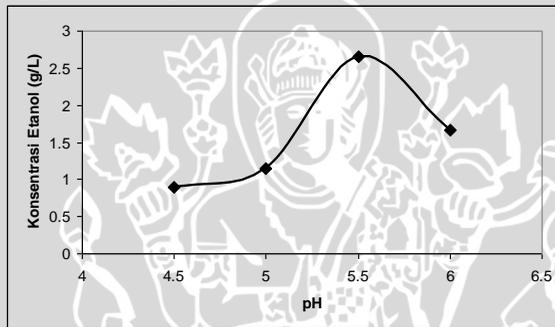
Pada proses fermentasi pembentukan etanol, bahan-bahan yang mengandung monosakarida  $C_6H_{12}O_6$  sebagai glukosa dapat langsung difermentasi, akan tetapi disakarida, pati maupun karbohidrat kompleks harus dihidrolisis dulu menjadi monosakarida. Gula tersebut dimanfaatkan oleh *Saccharomyces cereviceae* untuk proses metabolisme sel melalui jalur glikolisis dan dihasilkan metabolit yang berupa etanol dan  $CO_2$ . Total gula hasil analisa ditambahkan dengan sukrosa. Hal ini disebabkan adanya kisaran total gula optimum yang harus dicapai untuk media fermentasi yaitu sebesar 14-18% (Sa'id, 1990). Oleh karena itu, whey ditambahkan dengan sukrosa sebanyak 13%.

Penambahan sukrosa juga dipakai untuk proses hidrolisis laktosa karena *Saccharomyces cereviceae* tidak mengandung enzim yang sanggup memecah laktosa. Menurut Rochmat (2006), terdapat tiga macam proses hidrolisis untuk menghasilkan gula sederhana yaitu hidrolisis menggunakan asam encer, asam pekat, dan enzim. Sukrosa dihidrolisis oleh enzim invertase, yang dihasilkan secara alamiah oleh *Saccharomyces cereviceae*, menghasilkan glukosa dan fruktosa. Selanjutnya enzim zimase berperan untuk mengkatalisis metabolisme glukosa dan fruktosa melalui proses glikolisis menghasilkan asam piruvat. Sebagian asam piruvat, hasil glikolisis digunakan untuk menghidrolisis laktosa menghasilkan glukosa dan galaktosa untuk dapat melalui proses glikolisis menghasilkan asam piruvat. Asam piruvat didekarboksilasi menjadi asetaldehid kemudian dihidrogenasi menjadi etanol dan gas  $CO_2$ .

#### 4.1 Penentuan pH Optimum

Salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan pembentukan produk dalam proses fermentasi adalah pH, karena setiap mikroorganisme mempunyai kisaran pH optimal. Dalam penelitian ini digunakan pH yang berbeda yaitu 4,5; 5,0; 5,5 dan 6,0. Pengaturan pH dilakukan dengan penambahan asam asetat dan basa amonia. Variasi pH dimaksudkan untuk mengetahui pH optimal yang diperlukan *Saccharomyces cereviceae* dalam proses fermentasi.

Parameter pembentukan produk etanol berdasarkan pada konsentrasi etanol. Konsentrasi etanol yang dihasilkan untuk masing-masing pH dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hubungan antara pH dengan Konsentrasi Etanol

Hasil analisis ragam pada lampiran 11 menunjukkan pH berpengaruh nyata terhadap konsentrasi etanol. Kemudian dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% sehingga didapatkan hasil seperti pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Analisis BNT 5% pH Terhadap Konsentrasi Etanol(g/L)

pH	Konsentrasi Etanol Rata-rata (g/L)	BNT <sub>0,05</sub> (= 0,17)
4,5	0,90	a
5,0	1,14	b
5,5	2,65	d
6,0	1,66	c

Hasil uji BNT 5% pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa setiap perlakuan menunjukkan beda nyata. Hal ini dibuktikan dengan nilai

$F_{hitung} (222,53) > F_{tabel} (4,07)$ . Nilai pH media fermentasi mempengaruhi aktivitas *Saccharomyces cereviceae* sehingga akan berpengaruh pada konsentrasi etanol yang dihasilkan. Menurut Rahmadi (2009), kondisi pH lingkungan mempengaruhi ekspresi gen dalam mikroba. Ekspresi gen kemudian akan berdampak pada perpindahan proton, degradasi asam amino, adaptasi terhadap kondisi asam-basa. pH juga berpengaruh terhadap kemampuan reproduksi dan metabolisme intraseluler. Pada pH yang tidak ideal, dibutuhkan banyak energi untuk menyerap nutrisi dari luar, membuang nutrisi dari dalam, sehingga kemampuan berkembang biak menurun.

Pada Gambar 4.1 dapat dilihat bahwa konsentrasi etanol meningkat dari pH 4,5-5, optimum pada pH 5,5 dan menurun pada pH 6. Pada pH 4,5 dan pH 5 produk etanol yang didapatkan masih rendah karena kondisi pH yang rendah untuk pertumbuhan *Saccharomyces cereviceae* sehingga cadangan energinya digunakan untuk mempertahankan kehidupan sel. Pada pH 5,5 konsentrasi etanol yang dihasilkan maksimal karena pertumbuhan *Saccharomyces cereviceae* maksimal sehingga *Saccharomyces cereviceae* dapat melakukan metabolisme secara maksimal menghasilkan metabolit etanol. Pada pH 6 terjadi penurunan produk etanol karena kondisi pH yang tinggi untuk pertumbuhan *Saccharomyces cereviceae* sehingga cadangan energinya digunakan untuk mempertahankan kehidupan sel.

Kecenderungan kurva yang naik pada pH 5,5 juga disebabkan oleh kerja enzim yang sangat spesifik tergantung pada jenis enzim yang berasal dari mikroorganisme dan substrat yang digunakan. Setiap jenis enzim tersusun oleh asam-asam amino dengan komposisi yang berbeda-beda, sehingga memiliki pH optimum yang berbeda-beda pula. Ketika enzim berada di luar pH optimum maka aktivitas enzim akan terganggu atau bahkan rusak karena adanya proses denaturasi.

Menurut Sahrul (2008), bila aktivitas enzim diukur pada pH yang berlainan, maka sebagian besar enzim akan menunjukkan aktivitas optimum. Hal ini disebabkan oleh :

1. Pada pH rendah atau tinggi, enzim akan mengalami denaturasi.
2. Pada pH rendah atau tinggi, enzim maupun substrat dapat mengalami perubahan muatan listrik dan mengakibatkan perubahan aktivitas enzim.

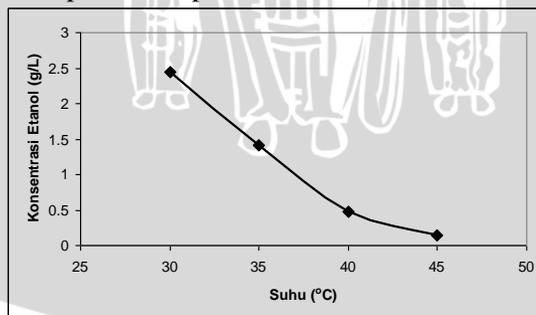
Hampir semua enzim sangat sensitif pada pH, dan biasanya aktivitasnya berkurang bila pH media berubah dari pH yang merupakan pH aktivitasnya. Pada penelitian ini kondisi pH optimum adalah 5,5. Hal ini sesuai dengan pernyataan Prescott *and* Dunn (1981), bahwa pH pertumbuhan *Saccharomyces cereviceae* adalah antara 4,0-6,0. Pada kondisi pH 5,5 dimungkinkan *Saccharomyces cereviceae* lebih aktif dalam mengkonsumsi gula yang terdapat dalam media karena berada pada kondisi yang sesuai untuk proses metabolisme sel sehingga produksi etanol yang dihasilkan lebih maksimal.

#### 4.2 Penentuan Suhu Inkubasi Optimum

Faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan dan pembentukan produk dalam proses fermentasi yaitu suhu inkubasi karena setiap mikroorganisme mempunyai kisaran suhu optimal. Suhu optimum untuk fermentasi pembentukan etanol berkisar 28-35<sup>o</sup>C (Daulay dan Rahman, 1992). Pada suhu di bawah suhu optimum, aktifitas *Saccharomyces cereviceae* akan lambat sedangkan pada suhu yang tinggi akan menyebabkan kematian mikroorganisme dan cocok bagi pertumbuhan bakteri kontaminan. (Tambunan, 1995).

Dalam penelitian ini digunakan suhu inkubasi yang berbeda yaitu 30<sup>o</sup>C, 35<sup>o</sup>C, 40<sup>o</sup>C dan 45<sup>o</sup>C. Variasi suhu dimaksudkan untuk mengetahui suhu optimal yang diperlukan *Saccharomyces cereviceae* dalam proses fermentasi. Karena menurut Wijiyono (2008), suhu fermentasi mempengaruhi konsentrasi etanol yang dihasilkan, laju fermentasi, laju pertumbuhan, fase lag, enzim dan fungsi membran.

Konsentrasi etanol yang diperoleh untuk masing-masing variasi suhu inkubasi dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar. 4.2 Hubungan antara Suhu Inkubasi dengan Konsentrasi Etanol

Hasil analisis ragam pada lampiran 12 menunjukkan suhu inkubasi berpengaruh nyata terhadap konsentrasi etanol. Kemudian dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% sehingga didapatkan hasil seperti pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Analisis BNT 5% Suhu Inkubasi Terhadap Konsentrasi Etanol (g/L)

Suhu Inkubasi (°C)	Konsentrasi Etanol Rata-rata (g/L)	BNT <sub>0,05</sub> (= 0,196)
30	2,45	d
35	1,42	c
40	0,48	b
45	0,14	a

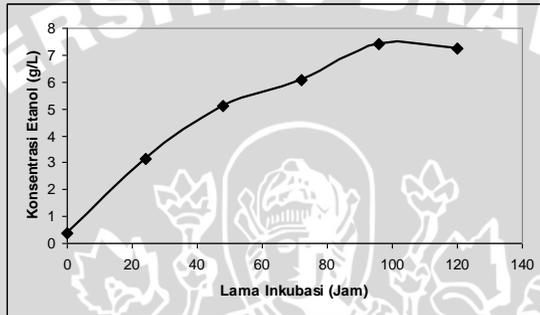
Hasil analisis BNT 5% suhu inkubasi terhadap konsentrasi etanol pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa setiap perlakuan menunjukkan beda nyata. Hal ini dibuktikan dengan nilai  $F_{hitung} (295,65) > F_{tabel} (4,07)$ . Gambar 4.2 menunjukkan konsentrasi etanol tertinggi diperoleh pada suhu inkubasi 30°C. Semakin tinggi suhu inkubasi, konsentrasi etanol yang diperoleh semakin menurun. Menurut Daulay dan Rahman (1992), sel khamir dapat tumbuh dan memproduksi etanol secara efisien pada suhu 28-35°C dan pada suhu di atas 35°C, produksi etanol mengalami penurunan karena kematian mikroorganisme. Suhu inkubasi optimum hasil penelitian yaitu pada suhu 30°C sesuai dengan pernyataan Faridah dkk (2008), yang menyatakan bahwa pada suhu 20-32°C merupakan temperatur pertumbuhan yang baik untuk *Saccharomyces cereviceae* dan pada temperatur tersebut cocok untuk *Saccharomyces cereviceae* melakukan fermentasi, sedangkan pada temperatur di atas 38°C reaksi fermentasi akan berjalan lambat.

Menurut Girinda (1993), reaksi fermentasi pada suhu optimum berlangsung paling cepat. Tetapi, kenaikan temperatur di atas temperatur optimum akan menyebabkan enzim mengalami denaturasi karena enzim merupakan protein, akibatnya daya kerja enzim akan menurun. Denaturasi merupakan peristiwa penyimpangan dari sifat alamiah protein. Enzim memiliki temperatur optimum yaitu temperatur yang menyebabkan kecepatan reaksi menjadi maksimum jika konsentrasi enzim dan substrat konstan. Oleh sebab itu, produksi etanol hasil fermentasi di atas suhu 30°C mengalami penurunan karena kinerja enzim menurun.

### 4.3 Penentuan Lama Inkubasi Optimum

Lamanya waktu inkubasi berpengaruh pada hasil etanol yang diperoleh. Oleh karena itu diperlukan optimasi lama inkubasi untuk mendapatkan hasil etanol maksimal. Dalam penelitian ini digunakan variasi lama inkubasi, yaitu: 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam.

Konsentrasi etanol yang diperoleh untuk masing-masing variasi lama inkubasi dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar. 4.3 Hubungan antara Lama Inkubasi dengan Konsentrasi Etanol

Hasil analisis ragam pada lampiran 13 menunjukkan lama inkubasi berpengaruh nyata terhadap konsentrasi etanol. Kemudian dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% sehingga didapatkan hasil seperti pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil Analisis BNT 5% Lama Inkubasi Terhadap Konsentrasi Etanol (g/L)

Lama Inkubasi (jam)	Konsentrasi Etanol Rata-rata (g/L)	BNT <sub>0,05</sub> (= 0,121)
0	0,38	a
24	3,16	b
48	5,12	c
72	6,09	d
96	7,42	f
120	7,24	e

Hasil analisis BNT 5% lama inkubasi terhadap konsentrasi etanol pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa setiap perlakuan menunjukkan beda nyata. Hal ini dibuktikan dengan nilai  $F_{hitung}$

(4795,8478) >  $F_{tabel}$  (3,11). Gambar 4.3 menunjukkan peningkatan konsentrasi etanol diperoleh sampai jam ke-96. Hal ini karena glukosa hasil hidrolisis tersedia dalam media dan *Saccharomyces cereviceae* bekerja aktif. Setelah melewati 96 jam, konsentrasi etanol yang dihasilkan mengalami penurunan. Semakin lama waktu fermentasi, laju pertumbuhan spesifik *Saccharomyces cereviceae* semakin menurun. Penurunan populasi *Saccharomyces cereviceae* disebabkan karena tidak terdapat nutrisi yang cukup untuk kebutuhan metabolisme berupa karbohidrat monosakarida karena glukosa hasil hidrolisis, yang biasanya diperoleh dari cuplikan media yang difermentasi, telah habis difermentasi oleh *Saccharomyces cereviceae*, kematian *Saccharomyces cereviceae* sehingga tidak berperan lagi dalam proses fermentasi. Penurunan konsentrasi etanol ini juga disebabkan karena etanol yang dihasilkan telah mengalami oksidasi sehingga etanol berubah menjadi asam asetat.

Pada penelitian ini, lama inkubasi optimum mencapai jam ke-96. Hal ini dimungkinkan karena pada penelitian ini menggunakan substrat laktosa. Laktosa merupakan disakarida, namun pada proses fermentasi menggunakan *Saccharomyces cereviceae* tidak dihasilkan enzim yang dapat menghidrolisis laktosa (faridah, 2008) maka dibutuhkan bantuan sukrosa untuk proses hidrolisis laktosa sehingga fermentasi laktosa menjadi lebih kompleks dan fermentasi menjadi lebih lama.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa perlakuan pH, suhu inkubasi dan lama inkubasi memberikan pengaruh nyata terhadap pembentukan etanol. Pembentukan etanol optimal terjadi pada pH 5,5, suhu inkubasi 30°C dan lama inkubasi 96 jam menghasilkan 7,42 g/L etanol.

#### **5.2 Saran**

Dalam upaya mengoptimalkan produksi etanol dari whey disarankan ada penelitian lebih lanjut mengenai faktor-faktor lain yang mempengaruhi proses fermentasi seperti penambahan sumber karbon, sumber nitrogen dan optimasi khamir yang digunakan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Amerin, M.A., H.W. Berg, R.E. Kunkee, C.S. Ough, V.I. Singleton and A.D Webb, 1987, *Technology of Wine Making*, The AVI Publishing Co. Inc, Wessport. Connecticut
- Anonim<sup>a</sup>, 2003, Alkohol, <http://id.wikipedia.org/wiki/alkohol>, Diakses tanggal 13 Desember 2008
- \_\_\_\_\_<sup>b</sup>, 2008, Apa Itu Whey, <http://www.halalguide.info/content/view>, Diakses tanggal 13 Desember 2008
- \_\_\_\_\_<sup>c</sup>, 2009, Analisis Kuantitatif Secara Volumetri, [http://chem-is-try.org/Situs\\_Kimia\\_Indonesia.htm](http://chem-is-try.org/Situs_Kimia_Indonesia.htm), Diakses tanggal 20 Juni 2009
- Anonymous<sup>a</sup>, 1999, *Optimax 4060 VHP Sacharifying and Debranching Enzyme*, Genencor International, New York
- \_\_\_\_\_<sup>b</sup>, 2008, Determination of Ethanol Concentration in Aqueous Solutions, [www.outreach.canterbury.ac.nz](http://www.outreach.canterbury.ac.nz), Diakses tanggal 13 Desember 2008
- Apriyantono, A, 2003, Titik Rawan Keju, <http://groups.yahoo.com/group/Halal-Baik-Enak/message/5199>, Diakses Tanggal 5 Januari 2009
- Binati, F. S, E, Zulaika dan T, Nurhidayati, 2008, Pengaruh Penambahan Enzim  $\alpha$ -Amilase Pada Fermentasi Karbohidrat Ekstrak *Ulva fasciata* dari Balekambang, Malang Menggunakan Ragi Roti Fermipan, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Clark, Jr.W.S, 1992, Whey: Composition, Properties, Processing And Technology, *Encyclopedia of Food Science and Technology*. Vol 4, John Wiley and Sons. Inc, New York
- Daulay, D. dan A. Rahman. 1992, *Teknologi Fermentasi Sayuran dan Buah-buahan*, PAU, IPB, Bogor
- Elevri, P.A dan S. R, Putra, 2006, Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae* yang Diamobilisasi Dengan Agar Batang, *Akta Kimindo* Vol. 1 No. 2 April 2006

- Fardiaz, S. dan F.G. Winarno, 1989, Pengantar Teknologi Pangan, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Faridah, A, K.S, Pada, A, Yulastri, L, Yusuf, 2008, Patiseri Jilid 1, Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan, Departemen Pendidikan Nasional
- Fessenden, R.J dan J.S. Fessenden, 1989, Kimia Organik Jilid 1, Airlangga, Jakarta
- Fifianti, S.D, 2009, Pengaruh Suhu, Konsentrasi Asam Asetat dan Konsentrasi Bromelin Terhadap Protein Terkoagulasi, Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang
- Girindra, A., 1993, Biokimia 1, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Hart, H, 1991, Organic Chemistry : A Short Course, Eight edition, Houghton Mifflin Company, USA
- Henry, A., M.T. Suryadi dan A. Yanuar, 2002, Analisis Spektrofotometri UV-Vis Pada Obat Influenza dengan Menggunakan Aplikasi Sistem Persamaan Linier, <http://repository.gunadarma.ac.id:8000/372/1/A01-11-Arthur-Hendry.pdf>, Diakses tanggal 29 Mei 2009
- Jenie, B.S.L dan W.P. Rahayu, 1993, Penanganan Limbah Industri Pangan, Penerbit Kanisius, Yogyakarta
- Judoamidjojo, M., A. Darwis, E.G. Sa'id, 1990, Teknologi Fermentasi, PAU Bioteknologi, IPB, Bogor
- Lehninger, A.L, 1982, Dasar-Dasar Biokimia, Erlangga, Jakarta
- Maiorella, B.L, 1985, Ethanol in Mold Young, Comprehensive Biotechnology, Vol III. Orgamon Press, Frankfurt
- Mc. William, 2001, Food, Prentice Hall Inc, New Jersey
- Novitasari, E.W, E, Rosaliana, I, Susanti, N.E, Jayanti, 2008, Pembuatan Etanol dari Kulit Nenas, [http://bioindustri.blogspot.com/2008\\_05\\_01\\_archive.html](http://bioindustri.blogspot.com/2008_05_01_archive.html), Diakses tanggal 31 Juli 2009
- Nurwantoro dan S.J, Abbas, 1996, Mikrobiologi Pangan Hewani-Nabati, UI Press, Jakarta

- Prescott, S.C. and C.G. Dunn, 1981, *Industrial Microbiology*, McGraw Hill Book Co. Ltd, London
- Pretitis, S, 1990, *Bioteknologi*, Erlangga. Jakarta
- Purba, M., 1996, *Ilmu Kimia*, Erlangga, Jakarta
- Rahmadi, A, 2009, *Dasar-Dasar Fermentasi*, <http://faperta.unmul.ac.id/arahmadi/tekfer-kuliah-1.2.doc>, Diakses 23 Agustus 2009
- Riviere, J, 1977, *Industrial Applications of Microbiology*, Surrey University Press, London
- Rochmat, A, I, Kustiningsih, D, Dermady, A, Suharsih, 2006, *Prosiding Seminar Nasional:Pemanfaatan Kertas Bekas Sebagai Bahan Baku Alternatif Pembuatan Etanol*, <http://www.scribd.com/doc/2559001/Prosiding-Seminar-Nasional-HKI-2006>, Diakses 31 Juli 2009
- Sa'id, E.G, 1987, *Bioindustri-Penerapan Teknologi Fermentasi*, PT. Mediatama Sarana Perkasa, Jakarta
- Sahrul, 2008, *Enzim*, [http://healthycaus.blogspot.com/2008\\_11\\_13\\_archive.html](http://healthycaus.blogspot.com/2008_11_13_archive.html), Diakses tanggal 12 Agustus 2009.
- Sardjoko, 1991, *Bioteknologi-Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Shiddieq, M I, 2007, *Memetik Manfaat Susu Sapi*, <http://1ggplus.wordpress.com/2007/11/05/memetik-manfaat-susu-sapi/>, Diakses tanggal 21 Desember 2008
- Smith, E.J, 1993, *Prinsip Bioteknologi*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Suharto, I, 1995, *Bioteknologi dalam Dunia Industri*, Andi offset, Yogyakarta
- Suhartono, M.T, 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, PAU Bioteknologi, IPB, Bogor
- Tambunan, U.S.F, 1995, *Peranan Bioteknologi Pada Pengembangan Proses Biotransformasi*, BPPT, Jakarta

Varnam, A. H and J. P. Sutherland, 1994, Beverages, Technology, Chemistry and Microbiology, Chapman and Hall, London

Wibowo, D, 1990, Dasar-dasar Teknologi Fermentasi, PAU Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta

Wijiyono, 2008, Fisiologo Mikrobiologi: Efektivitas Penambahan Amonium Terhadap Pertumbuhan dan Laju Fermentasi *Saccharomyces cerevisiae* dalam Pembuatan Anggur, <http://wijiyovan.wordpress.com/2008/10/21/efektivitas-penambahan-amonium-terhadap-pertumbuhan-dan-laju-fermentasi-saccharomyces-cerevisiae-dalam-pembuatan-anggur/>, Diakses tanggal 31 Juli 2009



## Lampiran 1.

### Penyiapan Larutan dan Bahan Untuk Analisa

#### L.1.1 Larutan Fenol 5 % (b/v)

Ditimbang 5 gram fenol dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Diencerkan dengan aquades sampai tanda batas. Larutan disimpan dalam botol gelas.

Perhitungan:

$$\begin{aligned}\text{Persen berat (\% b/v)} &= \frac{\text{berat}}{\text{volume}} \\ &= \frac{5 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} \\ &= 5 \% \text{ (b/v)}\end{aligned}$$

#### L.1.2 Larutan CH<sub>3</sub>COOH 25 %

Dipipet 25 mL CH<sub>3</sub>COOH 99,8 % dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Diencerkan dengan aquades sampai tanda batas.

#### L.1.3 Larutan Baku Glukosa 1000 ppm

Ditimbang glukosa p.a sebanyak 1,00 gram, dilarutkan dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 1000 mL sampai tanda batas.

Perhitungan:

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi (ppm)} &= 1,00 \text{ g}/1000 \text{ mL} \\ &= 1.000.000 \text{ }\mu\text{g}/1000 \text{ mL} \\ &= 1000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

#### L.1.4 Larutan Glukosa 100 ppm

Dipipet 10 mL larutan stok glukosa 1000 ppm dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas.

Perhitungan:

$$\begin{aligned}V_2 \times M_2 &= V_1 \times M_1 \\ M_2 &= (10 \times 1000) : 100 \\ &= 100 \text{ ppm}\end{aligned}$$

### **L.1.5 Larutan Baku Glukosa**

Dipipet masing-masing 2, 4, 6, 8, dan 10 mL larutan glukosa 100 ppm. Kemudian diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas, sehingga didapatkan konsentrasi larutan baku masing-masing 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Setiap konsentrasi dipipet 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 1 mL larutan fenol 5 % dan ditambahkan dengan 5 mL larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung. Didiamkan selama 30 menit dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Perlakuan yang sama terhadap blanko (0 ppm).

### **L.1.6 Larutan Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,03 M**

Ditimbang 0,936 gram Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, dilarutkan dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 100 mL.

### **L.1.7 Larutan KI 1,2 M**

Ditimbang 5 gram KI dan dilarutkan dalam 25 mL aquades.

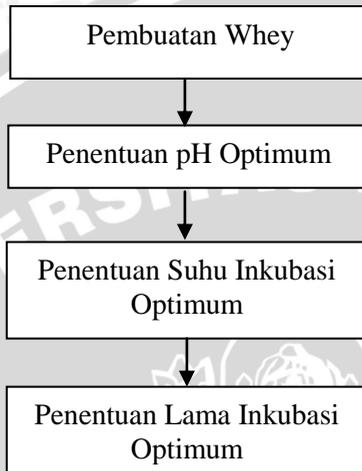
### **L.1.8 Larutan K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dalam Suasana Asam (0,01M dalam 5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

Aquades sebanyak 50 mL dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL dan ditambahkan dengan 28 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> secara perlahan melalui dinding erlenmeyer dan digoyang konstan. Didinginkan dengan diberi air kran di bagian bawah. Selanjutnya, ditambahkan 0,3 gram K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dan diaduk. Dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas dengan aquades.

### **L.1.9 Larutan Amilum**

Ditimbang 1 gram kanji dan dilarutkan dalam 100 mL air panas dan diaduk.

**Lampiran 2.**  
**Tahapan Penelitian**



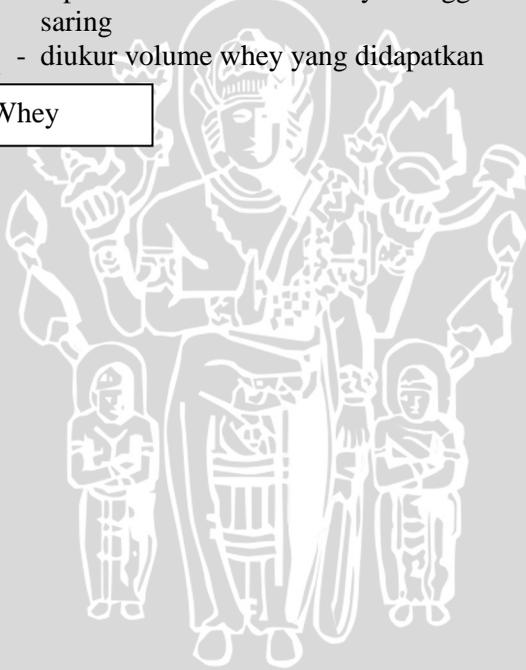
### Lampiran 3.

#### Diagram Pembuatan Media Fermentasi

Susu sapi segar

- dipanaskan hingga suhunya mencapai 70-80°C
- dituang dalam wadah plastik
- didinginkan sampai suhu 30 °C
- ditambah larutan CH<sub>3</sub>COOH sebanyak 1% (v/v)
- diaduk perlahan
- didiamkan hingga terbentuk gumpalan
- dipisahkan curd dari whey menggunakan kertas saring
- diukur volume whey yang didapatkan

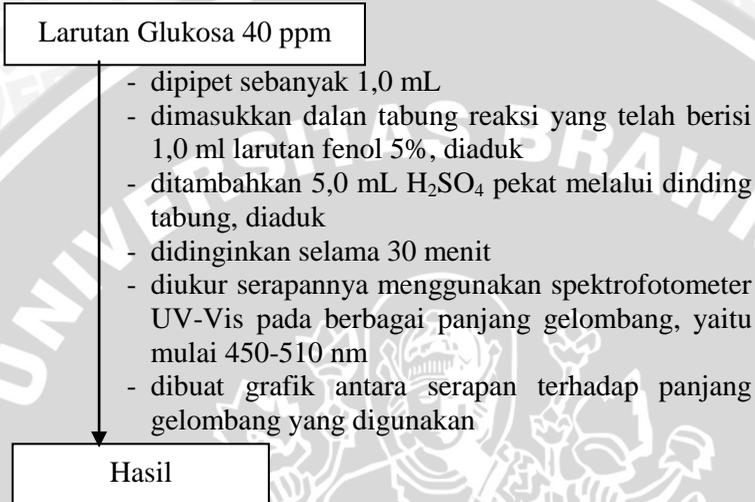
Whey



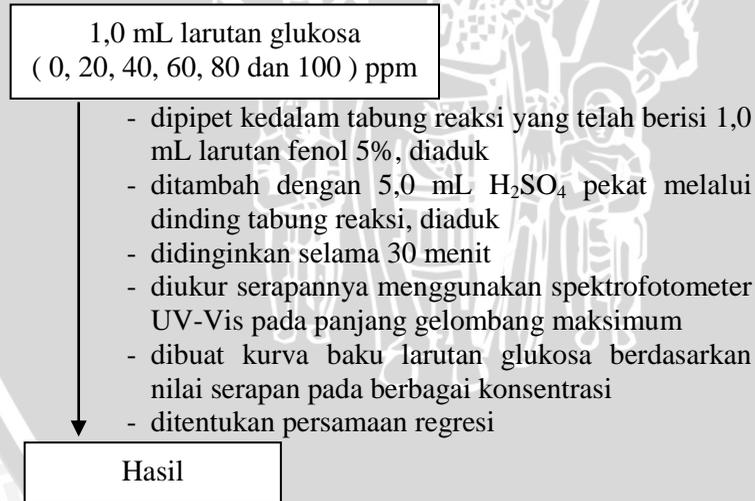
## Lampiran 4.

### Diagram Analisa Kadar Gula Total

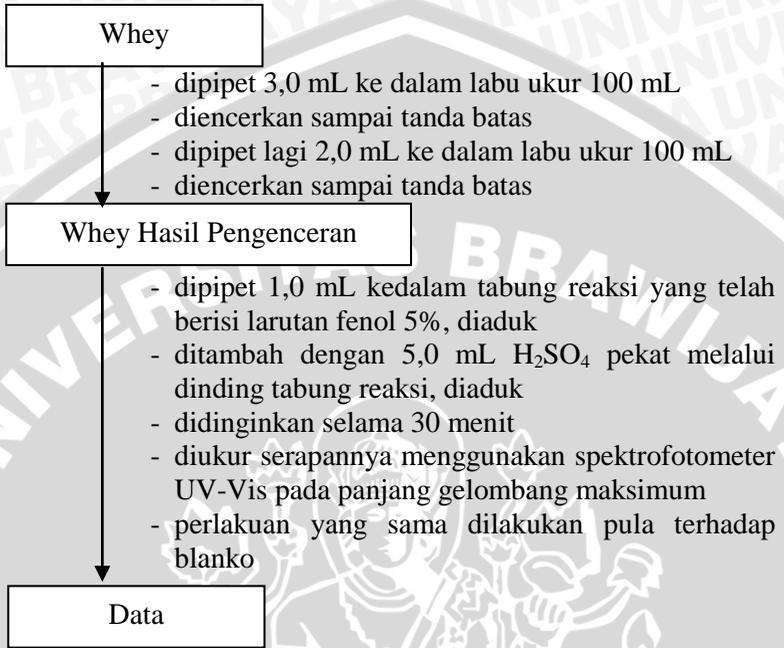
#### L.4.1 Menentukan Panjang Gelombang Maksimum Glukosa



#### L.4.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa



### L.4.3 Analisa Kadar Gula Total dalam Whey



## Lampiran 5.

### Diagram Penentuan pH Optimum

Whey

- diukur sebanyak 85 mL
- dimasukkan dalam beaker glass 100 ml
- ditambah 13 gram sukrosa dan diaduk
- ditambah 0,25 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan diaduk
- diatur pH menggunakan pH meter dengan variasi pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 dengan penambahan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  atau  $\text{NH}_3$  pekat
- dibuat volume total menjadi 100 mL
- dipanaskan sampai suhu  $30^\circ\text{C}$
- ditambah fermipan sebanyak 3 gram
- ditutup fermentor
- diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator pada suhu  $30^\circ\text{C}$
- ditentukan konsentrasi etanol dengan metode titrasi redoks

Data

## Lampiran 6.

### Diagram Penentuan Suhu Inkubasi Optimum

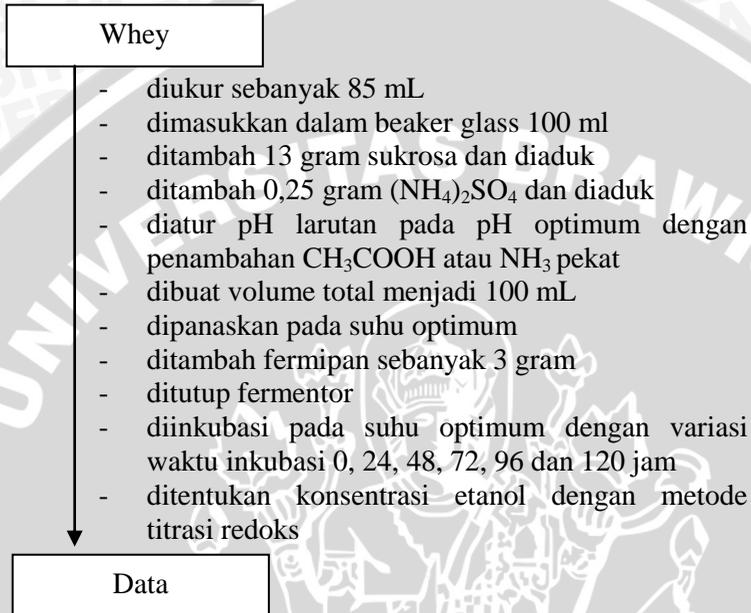
Whey

- diukur sebanyak 85mL
- dimasukkan dalam beaker glass 100 ml
- ditambah 13 gram sukrosa dan diaduk
- ditambah 0,25 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan diaduk
- diatur pH larutan pada pH optimum dengan penambahan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  atau  $\text{NH}_3$  pekat
- dibuat volume total menjadi 100 mL
- dipanaskan pada variasi suhu  $30^\circ\text{C}$ ,  $35^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $45^\circ\text{C}$
- ditambah fermipan sebanyak 3 gram
- ditutup fermentor
- diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator pada variasi suhu masing-masing
- ditentukan konsentrasi etanol dengan metode titrasi redoks

Data

## Lampiran 7.

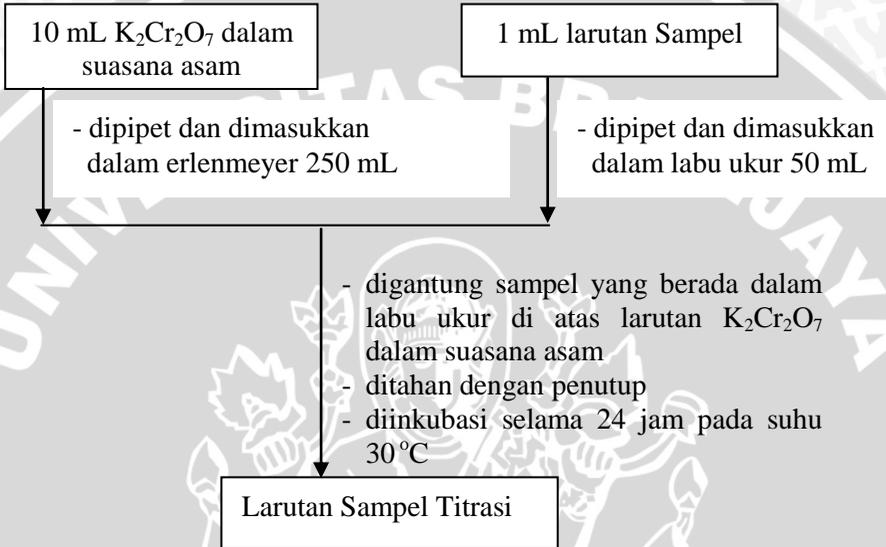
### Diagram Penentuan Lama Inkubasi Optimum



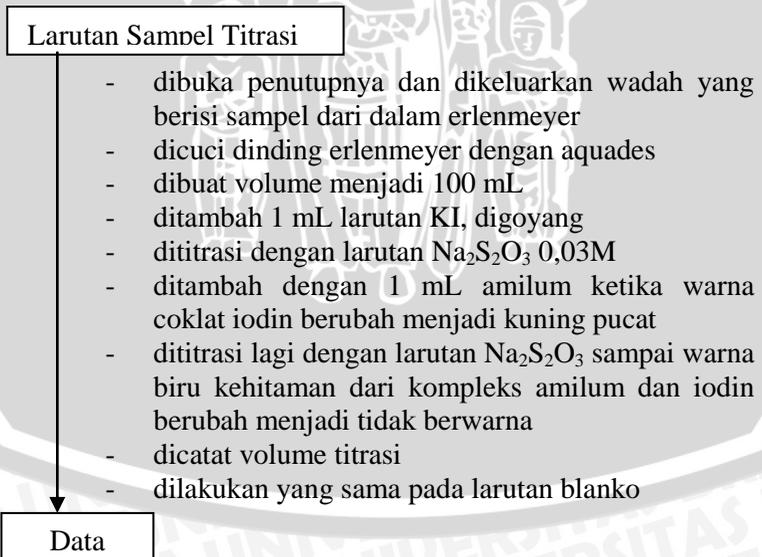
## Lampiran 8.

### Diagram Penentuan Konsentrasi Etanol Menggunakan Metode Titrasi Redoks

#### L.8.1 Oksidasi Etanol



#### L.8.2 Titrasi Redoks



## Lampiran 9.

### Penentuan Kadar Gula Total Dalam Whey

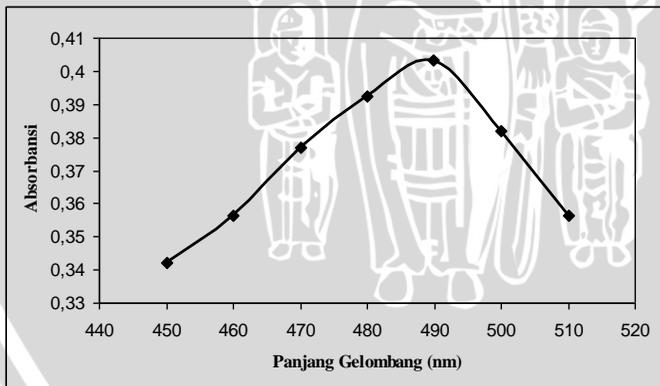
#### L.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Glukosa

Penentuan panjang gelombang maksimum glukosa dengan penambahan fenol 5% dan  $H_2SO_4$ . Larutan glukosa 40 ppm ditentukan nilai absorbansinya pada berbagai panjang gelombang yaitu antara 450 nm sampai 510 nm. Hubungan antara panjang gelombang terhadap nilai absorbansi larutan glukosa dengan fenol 5% dan  $H_2SO_4$  dapat dilihat pada tabel. L.9.1 dan gambar. L.9.1

Tabel. L.9.1 Data nilai absorbansi glukosa 40 ppm pada berbagai panjang gelombang

$\lambda$ (nm)	Absorbansi
450	0,3420
460	0,3565
470	0,3768
480	0,3925
490	0,4034*
500	0,3820
510	0,3565

Keterangan \*: adalah panjang gelombang maksimum glukosa



Gambar. L.9.1 Kurva penentuan panjang gelombang maksimum glukosa

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif suatu zat merupakan panjang gelombang dimana zat yang bersangkutan memberikan serapan yang maksimum ( $\lambda$  maks). (Henry dkk, 2002). Dari Gambar L.9.1 menunjukkan bahwa larutan glukosa dengan penambahan fenol 5% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> memberikan nilai serapan maksimum pada panjang gelombang 490 nm.

### L.9.2 Pembuatan Kurva Baku Glukosa

Larutan baku glukosa 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm ditentukan serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan, yaitu 490 nm. Hubungan antara konsentrasi (C) terhadap nilai absorbansi (A) dapat dilihat pada tabel. L.9.2

Tabel. L.9.2 Data nilai absorbansi glukosa berbagai konsentrasi hasil pengukuran pada panjang gelombang 490 nm.

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Absorbansi Rata-rata
	I	II	III	
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
20	0,1904	0,1838	0,1772	0,1838
40	0,4089	0,3468	0,3516	0,3691
60	0,4750	0,5157	0,5302	0,5069
80	0,7328	0,6990	0,6882	0,7067
100	0,8239	0,9031	0,8386	0,8552

#### L.9.2.1 Analisa Regresi Kurva Baku Glukosa

Tabel. L.9.3 Perhitungan persamaan regresi glukosa

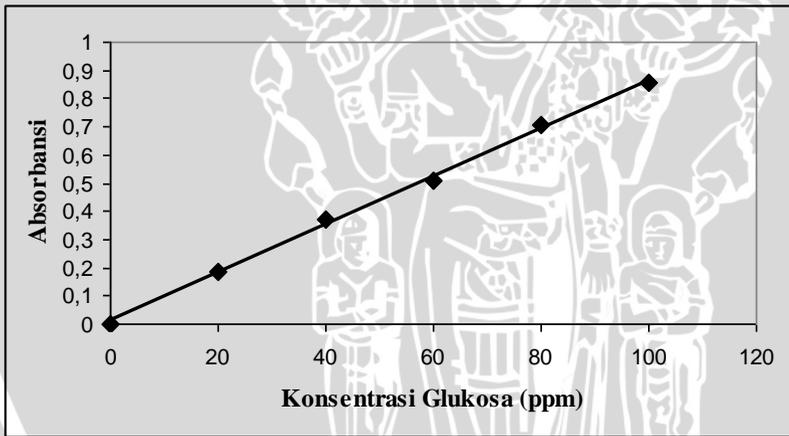
No	X	Y	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY
1.	0	0	0	0	0
2.	20	0,1838	400	0,0338	3,68
3.	40	0,3691	1600	0,1362	14,76
4.	60	0,5069	3600	0,2569	30,42
5.	80	0,7067	6400	0,4994	56,53
6.	100	0,8552	10000	0,7314	85,52
$\Sigma$	300	2,6217	22000	1,6577	190,91

Kurva baku glukosa dibuat berdasarkan data nilai serapan berbagai konsentrasi dengan menggunakan persamaan regresi lurus  $Y = b X$ . Nilai  $b$  (slope) dan  $r$  (koefisien korelasi) ditentukan dengan persamaan:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i}{\sum X_i^2}$$
$$= \frac{190,91}{22000}$$
$$= 0,0087$$

$$r = \frac{\sum X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}}$$
$$= \frac{190,91}{190,97}$$
$$= 0,9997$$

Persamaan regresi:  $Y = 0,0087X$



Gambar. L.9.2 Kurva baku glukosa

### L.9.3 Penentuan Konsentrasi Gula Total

#### Perhitungan Konsentrasi Gula Total dalam Whey

Dipipet 3,0 mL whey ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas. Selanjutnya, dipipet whey yang telah diencerkan tadi sebanyak 2,0 mL ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan lagi sampai tanda batas. Dipipet 1,0 mL larutan whey tersebut dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 1,0 mL larutan fenol 5%, diaduk. Selanjutnya ditambahkan 5,0 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung dan diaduk kembali. Setelah didinginkan selama 30 menit, diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya. Perlakuan yang sama dilakukan pula terhadap blanko. Serapan yang dihasilkan sebesar 0,2197. Dengan menggunakan persamaan regresi  $Y = 0,0087 X$  maka konsentrasi gula total dalam whey tersebut dapat dihitung sebagai berikut:

Persamaan regresi :  $Y = 0,0087 X$

$$X = \frac{Y}{0,0087}$$

$$X = \frac{0,2197}{0,0087}$$

$$X = 25,26 \text{ ppm}$$

Konsentrasi gula total =  $X \text{ (ppm)} \times fp$

$$= 25,26 \times \frac{10000}{6}$$

$$= 42100 \text{ ppm}$$

Konsentrasi gula total dalam whey sebesar 42100 ppm. Konsentrasi gula totalnya (%) dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi gula (\%)} = t \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \%$$

$$= 42100 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \%$$

$$= 4,21 \%$$

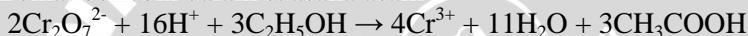
Konsentrasi gula total dalam whey sebesar 4,21 %.

## Lampiran 10.

### Penentuan Konsentrasi Etanol Dalam Larutan Menggunakan Metode Titrasi Redoks

Titration merupakan suatu metoda untuk menentukan konsentrasi suatu zat dengan menggunakan zat lain yang sudah diketahui konsentrasinya. Titrasi biasanya dibedakan berdasarkan jenis reaksi yang terlibat di dalam proses titrasi. Titrasi redoks merupakan titrasi yang melibatkan reaksi reduksi oksidasi (Anonim<sup>c</sup>, 2009).

Metode untuk menentukan konsentrasi etanol dalam larutan menggunakan metode titrasi redoks. Etanol dioksidasi menjadi asam etanoat (asam asetat) dengan mereaksikan menggunakan kalium dikromat berlebih dalam suasana asam



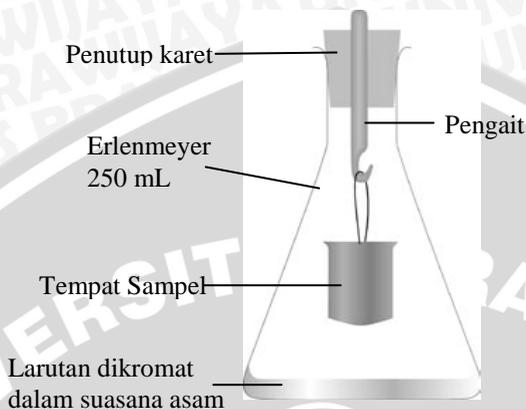
Jumlah dikromat yang tidak bereaksi ditentukan dengan penambahan larutan kalium iodida yang juga akan mengoksidasi kalium dikromat membentuk iodin.



Iodin kemudian dititrasi menggunakan larutan natrium tiosulfat dan hasil titrasi digunakan untuk menghitung kandungan etanol dalam larutan



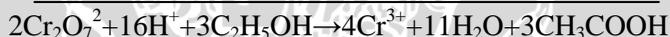
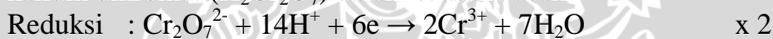
Karena larutan etanol sampel mengandung zat mudah teroksidasi lain yang dapat mengganggu titrasi, larutan dikromat diletakkan dalam erlenmeyer dan larutan etanol sampel diletakkan dalam tempat sampel. Air dan etanol perlahan akan menguap dan etanol akan berinteraksi dengan dikromat dan kemudian teroksidasi. Seluruh etanol dari larutan etanol sampel akan menguap sampai semua etanol habis dan bereaksi dengan dikromat. Karena proses ini memerlukan waktu, erlenmeyer dengan sampel diletakkan pada tempat yang hangat sepanjang malam (Anonymous<sup>b</sup>, 2008).



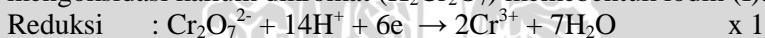
Gambar L.10 Skema alat untuk proses oksidasi

### Reaksi yang terjadi:

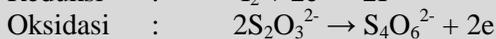
- Etanol dioksidasi menjadi asam asetat dengan penambahan kalium dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) dalam suasana asam



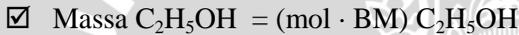
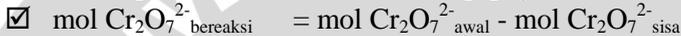
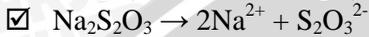
- Jumlah dikromat ( $Cr_2O_7^{2-}$ ) yang tidak bereaksi ditentukan dengan penambahan larutan kalium iodida (KI) yang juga akan mengoksidasi kalium dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) membentuk iodin (I).



- Iodin (I) kemudian dititrasi menggunakan larutan natrium tiosulfat ( $Na_2S_2O_3$ ) dan hasil titrasi digunakan untuk menghitung kandungan etanol dalam larutan



Berdasarkan persamaan reaksi di atas, dapat ditentukan hubungan antara mol natrium tiosulfat, mol kalium dikromat dan mol etanol, yaitu:



### Contoh Perhitungan Konsentrasi Etanol dalam Larutan Sampel:

Dipipet 10 mL larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  dalam suasana asam ke dalam erlenmeyer 250 mL. Dipipet 1 mL larutan sampel, dimasukkan ke dalam tempat sampel berupa labu ukur 5 mL. Kemudian digantung tempat yang berisi sampel di atas larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  dalam suasana asam. Ditahan dengan penutup dan diletakkan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu  $30^\circ\text{C}$ .

Erlenmeyer dikeluarkan pada suhu kamar, dibuka penutupnya dan dikeluarkan wadah yang berisi sampel. Dicuici dinding erlenmeyer dengan aquades dan dibuat volumenya menjadi 100 mL. Selanjutnya ditambahkan 1 mL KI dan digoyang. Langkah selanjutnya, siapkan larutan blanko, dipipet 10 mL larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  ke dalam erlenmeyer 250 mL, ditambah dengan 100 mL aquades dan 1 mL KI, digoyang. Isi buret dengan larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,03M dan titrasi masing-masing erlenmeyer. Ketika warna cokelat iodin berubah menjadi kuning, ditambahkan 1 mL amilum dan dititrasi kembali sampai warna biru kehitaman dari kompleks indikator dan iodin menjadi tidak berwarna. Dicatat volume titrasi. Kemudian dilanjutkan dengan titrasi sampel.

Dari proses titrasi ini didapatkan volume titrasi blanko 21,9 mL dan volume titrasi sampel 0,4 mL. Maka konsentrasi etanol dalam

larutan sampel hasil fermentasi tersebut dapat dihitung sebagai berikut:

☑ Mol dikromat awal

$$\begin{aligned} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 &\rightarrow 2\text{Na}^{2+} + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \\ \text{mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 &= \text{mol S}_2\text{O}_3^{2-} \\ \text{mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 &= (V \cdot M)\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \\ &= (V_{\text{titrasi blanko}}) \cdot [\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3] \\ &= 21,9 \text{ mL} \cdot 0,03 \text{ M} \\ &= 0,657 \text{ mmol} \\ \text{mol Cr}_2\text{O}_7^{2-} &= 1/6 \cdot \text{mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \\ &= 1/6 \cdot 0,657 \text{ mmol} \\ &= 0,1095 \text{ mmol} \end{aligned}$$

☑ Mol dikromat sisa

$$\begin{aligned} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 &\rightarrow 2\text{Na}^{2+} + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \\ \text{mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 &= \text{mol S}_2\text{O}_3^{2-} \\ \text{mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 &= (V \cdot M)\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \\ &= (V_{\text{titrasi sampel}}) \cdot [\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3] \\ &= 0,4 \text{ mL} \cdot 0,03 \text{ M} \\ &= 0,012 \text{ mmol} \\ \text{mol Cr}_2\text{O}_7^{2-} &= 1/6 \cdot \text{mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \\ &= 1/6 \cdot 0,012 \text{ mmol} \\ &= 0,002 \text{ mmol} \end{aligned}$$

☑ Mol dikromat yang bereaksi

$$\begin{aligned} \text{mol Cr}_2\text{O}_7^{2-} \text{ bereaksi} &= \text{mol Cr}_2\text{O}_7^{2-} \text{ awal} - \text{mol Cr}_2\text{O}_7^{2-} \text{ sisa} \\ &= 0,1095 \text{ mmol} - 0,002 \text{ mmol} \\ &= 0,1075 \text{ mmol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2 \text{ mol C}_2\text{H}_5\text{OH} &= 3 \text{ mol Cr}_2\text{O}_7^{2-} \\ \text{mol C}_2\text{H}_5\text{OH} &= 3/2 \text{ mol Cr}_2\text{O}_7^{2-} \\ &= 3/2 \cdot 0,1075 \text{ mmol} \\ &= 0,16125 \text{ mmol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa C}_2\text{H}_5\text{OH} &= (\text{mol} \cdot \text{BM}) \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \\ &= 0,16125 \text{ mmol} \cdot 46 \text{ mg/mL} \\ &= 7,4175 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi C}_2\text{H}_5\text{OH} &= \frac{\text{massa C}_2\text{H}_5\text{OH}}{\text{volume sampel}} \\ &= \frac{7,4175 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \\ &= 7,42 \text{ g/L} \end{aligned}$$

Konsentrasi etanol dalam sampel hasil fermentasi sebesar 7,42 g/L.

## Lampiran 11.

### Hasil Konsentrasi Etanol pada Berbagai Variasi pH dan Analisa Statistik

#### L.11.1 Konsentrasi Etanol pada Berbagai Variasi pH

Tabel. L.11.1 Konsentrasi etanol pada berbagai variasi pH

pH	Konsentrasi (g/L)			Jumlah	Konsentrasi Rata-rata (g/L)
	1	2	3		
4,5	0,85	0,97	0,88	2,70	0,90
5,0	1,16	1,07	1,19	3,42	1,14
5,5	2,81	2,60	2,55	7,96	2,65
6,0	1,71	1,69	1,57	4,97	1,66

$$FK = \frac{\left( \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^u Y_{ij} \right)^2}{n}; n = p \times u$$

$$= \frac{(0,85 + 1,16 + 2,81 + \dots + 1,57)^2}{4 \times 3}$$

$$= \frac{(19,05)^2}{12}$$

$$= \frac{362,9025}{12}$$

$$= 30,2419$$

$$JKT = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^u Y_{ij}^2 - FK$$

$$= (0,85^2 + 1,16^2 + 2,81^2 + \dots + 1,57^2) - 30,2419$$

$$= 35,7481 - 30,2419$$

$$= 5,5062$$

$$\begin{aligned}
 JKP &= \frac{\sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^u Y_{ij} \right)^2}{u} - FK \\
 &= \frac{(2,70^2 + 3,42^2 + 7,96^2 + 4,97^2)}{3} - 30,2419 \\
 &= \frac{107,0489}{3} - 30,2419 \\
 &= 35,6829 - 30,2419 \\
 &= 5,441 \\
 JKG &= JKT - JKP \\
 &= 5,5062 - 5,441 \\
 &= 0,0652
 \end{aligned}$$

### L.11.2 Analisis Ragam pH Terhadap Konsentrasi Etanol

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan analisa ragam satu arah untuk mengetahui pengaruh pH terhadap konsentrasi etanol. Hasil analisa ragam dapat dilihat pada Tabel. L.11.2

Tabel. L.11.2 Analisis ragam pH terhadap konsentrasi etanol

Sumber Varian	db	KJK	KKT	F hitung	F tabel (0,05)
Perlakuan	3	5,4410	1,8136	222,5276*	4,07
Galat	8	0,0652	0,0081		
Total	11	5,5062			

\* menunjukkan ada beda sangat nyata minimal satu perlakuan

Karena  $F_{hitung} > F_{tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi pH larutan sampel berpengaruh terhadap konsentrasi etanol. Untuk mengetahui variasi pH larutan sampel mana saja yang berpengaruh terhadap konsentrasi etanol, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$

### L.11.3 Analisis BNT 5% pH Terhadap Konsentrasi Etanol

$$\begin{aligned}
 \text{BNT}_{0,05} &= t_{0,05(8)} \times \sqrt{\frac{2KTG}{u}} \\
 &= 2,306 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,0081}{3}} \\
 &= 2,306 \times 0,0735 \\
 &= 0,17
 \end{aligned}$$

Tabel L.11.3 Hasil uji BNT 5% pH terhadap konsentrasi etanol

pH	pH	4,5	5,0	6,0	5,5	Notasi
	Konsentrasi Etanol rata-rata (g/L)	0,90	1,14	1,66	2,65	
4,5	0,90	0				a
5,0	1,14	0,24	0			b
6,0	1,66	0,76	0,52	0		c
5,5	2,65	1,75	1,51	0,99	0	d

## Lampiran 12.

### Hasil Konsentrasi Etanol pada Berbagai Variasi Suhu Inkubasi dan Analisa Statistik

#### L.12.1 Konsentrasi Etanol pada Berbagai Variasi Suhu Inkubasi

Tabel. L.12.1 Konsentrasi etanol pada berbagai variasi suhu inkubasi

Suhu Inkubasi (°C)	Konsentrasi Etanol (g/L)			Jumlah	Konsentrasi Rata-rata (g/L)
	1	2	3		
30	2,64	2,33	2,38	7,35	2,45
35	1,35	1,50	1,40	4,25	1,42
40	0,52	0,40	0,53	1,45	0,48
45	0,21	0,07	0,14	0,42	0,14

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{\left( \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^u Y_{ij} \right)^2}{n}; n = p \times u \\ &= \frac{(2,64 + 1,35 + 0,52 + \dots + 0,14)^2}{4 \times 3} \\ &= \frac{(13,47)^2}{12} \\ &= \frac{181,4409}{12} \\ &= 15,1201 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^u Y_{ij}^2 - \text{FK} \\ &= (2,64^2 + 1,35^2 + 0,52^2 + \dots + 0,14^2) - 15,1201 \\ &= 24,8753 - 15,1201 \\ &= 9,7552 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKP &= \frac{\sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^u Y_{ij} \right)^2}{u} - FK \\
 &= \frac{(7,35^2 + 4,25^2 + 1,45^2 + 0,42^2)}{3} - 15,1201 \\
 &= \frac{74,3639}{3} - 15,1201 \\
 &= 24,7879 - 15,1201 \\
 &= 9,6678 \\
 JKG &= JKT - JKP \\
 &= 9,7552 - 9,6678 \\
 &= 0,0874
 \end{aligned}$$

### L.12.2 Analisis Ragam Suhu Inkubasi Terhadap Konsentrasi Etanol

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan analisa ragam satu arah untuk mengetahui pengaruh suhu inkubasi terhadap konsentrasi etanol. Hasil analisa ragam dapat dilihat pada Tabel L.12.2.

Tabel L.12.2 Analisis ragam suhu inkubasi terhadap konsentrasi etanol

Sumber Varian	db	KJK	KKT	F hitung	F tabel (0,05)
Perlakuan	3	9,6678	3,2226	295,6513*	4,07
Galat	8	0,0874	0,0109		
Total	11	9,7552			

\* menunjukkan ada beda sangat nyata minimal satu perlakuan

Karena  $F_{hitung} > F_{tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi suhu inkubasi larutan sampel berpengaruh terhadap konsentrasi etanol. Untuk mengetahui variasi suhu inkubasi larutan sampel mana saja yang berpengaruh terhadap konsentrasi etanol, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$

### L.12.3 Analisis BNT 5% Suhu Inkubasi Terhadap Konsentrasi Etanol

$$\begin{aligned}
 \text{BNT}_{0,05} &= t_{0,05(8)} \times \sqrt{\frac{2KTG}{u}} \\
 &= 2,306 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,0109}{3}} \\
 &= 2,306 \times 0,0852 \\
 &= 0,196
 \end{aligned}$$

Tabel L.12.3 Hasil uji BNT 5% suhu inkubasi terhadap konsentrasi etanol

Suhu Inkubasi (°C)	Suhu Inkubasi (°C)	45	40	35	30	Notasi
	Konsentrasi Etanol rata-rata (g/L)	0,14	0,48	1,42	2,45	
45	0,14	0				a
40	0,48	0,34	0			b
35	1,42	1,28	0,94	0		c
30	2,45	2,31	1,97	1,03	0	d

### Lampiran 13.

#### Hasil Konsentrasi Etanol pada Berbagai Variasi Lama Inkubasi dan Analisa Statistik

##### L.13.1 Konsentrasi Etanol pada Berbagai Variasi Lama Inkubasi

Tabel. L.13.1 Konsentrasi etanol pada berbagai variasi lama inkubasi

Lama Inkubasi (Jam)	Konsentrasi Etanol (g/L)			Jumlah	Konsentrasi Rata-rata (g/L)
	1	2	3		
0	0,31	0,33	0,50	1,14	0,38
24	3,14	3,09	3,24	9,47	3,16
48	5,16	5,07	5,14	15,37	5,12
72	6,19	6,02	6,05	18,26	6,09
96	7,42	7,40	7,43	22,25	7,42
120	7,25	7,26	7,23	21,74	7,24

$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{\left( \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^u Y_{ij} \right)^2}{n}; n = p \times u \\
 &= \frac{(0,31 + 3,14 + 5,16 + \dots + 7,23)^2}{6 \times 3} \\
 &= \frac{(88,23)^2}{18} \\
 &= \frac{7784,5329}{18} \\
 &= 432,4740
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKT &= \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^u Y_{ij}^2 - FK \\
 &= (0,31^2 + 3,14^2 + 5,16^2 + \dots + 7,23^2) - 432,4740 \\
 &= 542,8337 - 432,4740 \\
 &= 110,3597
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKP &= \frac{\sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^u Y_{ij} \right)^2}{u} - FK \\
 &= \frac{(1,14^2 + 9,47^2 + 15,37^2 + \dots + 21,74^2)}{3} - 432,4740 \\
 &= \frac{1628,3351}{3} - 432,4740 \\
 &= 542,7784 - 432,4740 \\
 &= 110,3044
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKG &= JKT - JKP \\
 &= 110,3597 - 110,3044 \\
 &= 0,0553
 \end{aligned}$$

### L.13.2 Analisis Ragam Lama Inkubasi Terhadap Konsentrasi Etanol

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan analisa ragam satu arah untuk mengetahui pengaruh lama inkubasi terhadap konsentrasi etanol. Hasil analisa ragam dapat dilihat pada Tabel L.13.2.

Tabel. L.13.2 Analisis ragam lama inkubasi terhadap konsentrasi etanol

Sumber Varian	db	KJK	KKT	F hitung	F table (0,05)
Perlakuan	5	110,3044	22,0609	4795,8478*	3,11
Galat	12	0,0553	0,0046		
Total	17	110,3597			

\* menunjukkan ada beda sangat nyata minimal satu perlakuan

Karena  $F_{hitung} > F_{tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak, artinya variasi lama inkubasi larutan sampel berpengaruh terhadap konsentrasi etanol. Untuk mengetahui variasi lama inkubasi larutan sampel mana saja yang berpengaruh terhadap konsentrasi etanol, maka dilakukan uji BNT dengan  $\alpha = 0,05$

**L.13.3 Analisis BNT 5% Lama Inkubasi Terhadap Konsentrasi Etanol**

$$\begin{aligned}
 \text{BNT}_{0,05} &= t_{0,05(12)} \times \sqrt{\frac{2KTG}{u}} \\
 &= 2,179 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,0046}{3}} \\
 &= 2,179 \times 0,0554 \\
 &= 0,121
 \end{aligned}$$

Tabel L.13.3 Hasil uji BNT 5% lama inkubasi terhadap konsentrasi etanol

Lama Inkubasi (jam)	Lama Inkubasi (jam)	0	24	48	72	120	96	Notasi
	Konsentrasi Etanol rata-rata (g/L)	0,38	3,16	5,12	6,09	7,24	7,42	
0	0,38	0						a
24	3,16	2,78	0					b
48	5,12	4,74	1,96	0				c
72	6,09	5,71	2,93	0,97	0			d
120	7,24	6,86	4,08	2,12	1,15	0		e
96	7,42	7,04	4,26	2,3	1,33	0,18	0	f